



Laurea magistrale in Biotecnologie Molecolari e Industriali

“Utilità diagnostica della rivelazione di infezioni multiple, carica virale ed integrazione del papillomavirus umano quali fattori prognostici nello screening secondario del carcinoma della cervice uterina.”

CANDIDATO:

Swan Donati

RELATORI:

Dott.ssa Loria Bianchi

(U.O. Microbiologia, Azienda USL3 pistoia, Ospedale San Jacopo)

Prof. Stefano Landi

(Dip. di Genetica, Università di Pisa)

INDICE

RIASSUNTO	4
INTRODUZIONE	7
I PAPILLOMAVIRUS	8
CLASSIFICAZIONE FILOGENETICA DEI PAPILLOMAVIRUS	9
CLASSIFICAZIONE IN BASE AL RISCHIO ONCOGENO	10
I VACCINI HPV	11
IL CICLO VITALE DELL'HPV	12
LESIONI PRE-CANCEROSE QUALI PRECURSORI DEL CARCINOMA CERVICALE: DEFINIZIONE, CLASSIFICAZIONE ED EVOLUZIONE NELLA CARCINOGENESI	15
DATI EPIDEMIOLOGICI RIGUARDANTI L'INFEZIONE DA HPV	19
METODI DI PREVENZIONE DEL CANCRO DELLA CERVICE UTERINA	20
SCREENING CERVICOVAGINALE: CONFRONTO FRA PAP TEST E TECNOLOGIE MOLECOLARI PER LA RICERCA DI HPV	20
AUTOPRELIEVO QUALE STRUMENTO PER AUMENTARE LA <i>COMPLIANCE</i> DELLE PAZIENTI NELLO SCREENING CERVICOVAGINALE	22
SAGGI MOLECOLARI PER LA RICERCA E GENOTIPIZZAZIONE DELL'HPV	23
VALUTAZIONE DELL'IMPORTANZA DI UN PRELIEVO IDONEO	31
INFEZIONI MULTIPLE DA PAPILLOMAVIRUS E POSSIBILE RUOLO COME MARKER DI PROGRESSIONE NEOPLASTICA	34
RUOLO DELLA CARICA VIRALE COME MARKER DI PROGRESSIONE NEOPLASTICA	34
CARICA VIRALE ED INFEZIONI MULTIPLE	37
RUOLO DEL GRADO DI INTEGRAZIONE DEL DNA VIRALE NEL GENOMA OSPITE COME MARKER DI PROGRESSIONE NEOPLASTICA	38
SCOPO DELLA TESI	41
MATERIALI E METODI	43
POPOLAZIONI DI STUDIO	43
PRE-TRATTAMENTO DEI CAMPIONI CITOLOGICI	44
PRE-TRATTAMENTO DEI CAMPIONI ISTOLOGICI	45

ESTRAZIONE DEL DNA	45
CONTROLLO INTERNO (IC)	45
CONTROLLO DI CELLULARITA'	46
CONTROLLO POSITIVO HPV 16 (NIBSC CODE: 06/202)	47
CONTROLLO NATIONAL EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SERVICE (NEQAS)	48
METODICHE UTILIZZATE PER LA RICERCA E GENOTIPIZZAZIONE DELL'HPV IN PCR CLASSICA	48
METODICHE DI RILEVAZIONE E GENOTIPIZZAZIONE DELL'HPV IN REAL-TIME PCR	56
METODICA IN REALTIME PCR DI QUANTIFICAZIONE DELL'HPV 16	59
ANALISI STATISTICA DEI DATI	61
<u>RISULTATI</u>	63
VALUTAZIONE DELL'ADEGUATEZZA DEL PRELIEVO	63
ANALISI DELLA CONCORDANZA DEI RISULTATI TRA I VARI METODI DI GENOTIPIZZAZIONE	64
CORRELAZIONE TRA ALTERAZIONE CITOLOGICA E LESIONE ISTOLOGICA	68
DISTRIBUZIONE DELLA POSITIVITA' E DEI GENOTIPI RILEVATI NELLE ALTERAZIONI CITOLOGICHE E ISTOLOGICHE	70
DISTRIBUZIONE DELLE COINFEZIONI NEI DIVERSI GRADI DI LESIONE ISTOLOGICA	76
DISTRIBUZIONE DELLE COINFEZIONI NEI DIVERSI GRADI DI LESIONE CITOLOGICA	77
VALUTAZIONE DELLA CARICA VIRALE E DEL GRADO DI INTEGRAZIONE DELL'HPV 16	80
VALUTAZIONE DELLA CARICA VIRALE NEI CAMPIONI CITOLOGICI	82
VALUTAZIONE DELLA CARICA VIRALE NEI CAMPIONI ISTOLOGICI	85
VALUTAZIONE DEL GRADO DI INTEGRAZIONE NEI CAMPIONI CITOLOGICI	87
VALUTAZIONE DEL GRADO DI INTEGRAZIONE NEI CAMPIONI ISTOLOGICI	90
CORRELAZIONE TRA CARICA E INTEGRAZIONE	91
<u>DISCUSSIONE</u>	92
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	102

RIASSUNTO

Introduzione. L'infezione da Papillomavirus Umano (Human Papilloma Virus, HPV) rappresenta la malattia virale a trasmissione sessuale più comune (*Markovitz et al, 2007*). È ormai consolidato il dato che pressoché il 100% di tutti i tumori della cervice uterina sono causati da un'infezione persistente del virus HPV (*Guo et al., 2007*) e che circa il 70% dei tumori cervicali sono causati dai genotipi 16 (55-60%) e 18 (10-15%) (*Muñoz et al., 2004; Saslow et al., 2012*). Poiché gran parte delle infezioni, anche con genotipi ad alto rischio oncogeno (HR-HPV), sono transienti, è emersa la necessità di identificare altri marcatori HPV-correlati in grado di individuare correttamente le donne con rischio elevato di sviluppare lesioni di alto grado. La genotipizzazione, la quantificazione della carica virale e del grado di integrazione sono fra i possibili candidati. L'integrazione del DNA virale nel genoma ospite, quando avviene, comporta la delezione del gene virale E2, importante fattore di regolazione della trascrizione delle proteine oncogeniche virali E6 ed E7 (*Manawapat et al., 2012*). I numerosi studi presenti in letteratura evidenziano dati contrastanti sul ruolo della carica e dell'integrazione nello sviluppo delle lesioni citologiche/istologiche della cervice uterina e scarsi sono i dati riguardo al ruolo delle infezioni multiple nella progressione neoplastica.

Scopo della tesi. Gli scopi di questo studio sono stati: a) valutare sensibilità, specificità e concordanza nei risultati tra vari metodi di genotipizzazione del virus HPV (PCR end-point e Real Time PCR); b) valutare il possibile ruolo prognostico di marcatori quali: 1) determinazione del genotipo; 2) presenza di infezioni multiple; 3) carica virale (limitatamente all'HPV16); 4) grado di integrazione virale (limitatamente all'HPV16).

Materiali e metodi. La casistica analizzata è costituita da pazienti afferenti alla U.O. Anatomia Patologica dell'ospedale di Pistoia per eseguire il test HPV come test di secondo livello, ed in particolare: 415 campioni ThinPrep con alterazioni citologiche (76 campioni ASC-US – Cellule squamose atipiche di incerto significato, 225 L-SIL – Lesioni intraepiteliali di basso grado, 55 ASC-H – Cellule squamose atipiche non escludenti lesioni intraepiteliali di alto grado e 59 H-SIL – Lesioni intraepiteliali di alto grado); i rispettivi 415 campioni istologici (116 senza alterazioni, 168 con lesione CIN – Neoplasia intraepiteliale cervicale - di grado 1, 81 con lesione CIN2, 46 con lesione CIN3 e 4 carcinomi) e 172 campioni citologici negativi di controllo. Il DNA dei campioni, estratto utilizzando il kit EZ1 Virus Mini v2.0 (Qiagen) con l'estrattore automatico EZ1 Advanced (Qiagen), è stato successivamente amplificato per la rilevazione e genotipizzazione

dell'HPV mediante PCR end-point e rivelazione con ibridazione inversa su striscia (AB Analitica, Innogenetics). L'idoneità del prelievo e la cellularità del campione è stata determinata mediante amplificazione con Real Time PCR (RT-PCR) quantitativa del gene umano HPRT1 (Cell Control r-gene, Biomerieux). La misurazione della carica di HPV 16 è stata effettuata mediante quantificazione in RT-PCR delle copie del gene virale E6 (Peitsaro *et al.*, 2002) e calcolata in rapporto al numero di cellule. La percentuale di genoma virale integrato è stata calcolata come la differenza tra le copie del gene E6 (presente sia in forma episomale sia integrata) e del gene E2 (presente solo in forma episomale) in rapporto alla carica totale.

Risultati. Il valore medio di cellularità ottenuto nei campioni citologici e istologici è rispettivamente $3.517.097 \pm 354.518$ cell/prelievo e 10.852 ± 836 cell/vetrino. Le due metodiche di genotipizzazione basate sull'ibridazione inversa su striscia, INNOLiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics) e AMPLIQUALITY HPV Type Express v.2.0 (AB ANALITICA) hanno una sensibilità ed una specificità rispettivamente di 94% vs 99% e specificità del 100%. Le metodiche RealTime PCR valutate, Dx HR-HPV Auto Assay (BIO-RAD), Uterine Cervix Cancer of High-risk HPV Genotype Related Real-time PCR (Liferiver) e RealLine HPV High Risk Genotype Fla-Format (BIORON) hanno una sensibilità paragonabile (>95%). La specificità rilevata è stata rispettivamente del 95%, 91% e 85%. Dall'analisi statistica effettuata con il Mc Nemar's test risulta che non ci sono differenze statisticamente significative ($p > 0.05$) tra i genotipi rilevati con tutte e 5 le metodiche di genotipizzazione valutate. La frequenza di positività globale all'HPV aumenta all'aumentare della gravità della lesione sia citologica che istologica (χ^2 , $p < 0,005$), così come la prevalenza degli HR-HPV (χ^2 , $p < 0,005$). L'HPV 16 risulta il genotipo più frequentemente rilevato nelle alterazioni citologiche e istologiche (22,9% e 35,59%) con Odds Ratio (OR) significativi per le lesioni ASC-H (OR = 2,26; IC 95% = 1,43-3,55), H-SIL (OR = 4,81; IC 95% = 3,19-7,24), CIN2 (OR = 2,59; IC 95% = 1,8-3,72) e CIN3+ (OR = 5,94; IC 95% = 3,83-9,19). Le coinfezioni totali nei campioni citologici (25% dei campioni positivi) variano significativamente al variare della lesione (χ^2 , $p < 0,005$), con un'incidenza più alta rilevata negli ASC-US (56%) e più bassa nelle lesioni di alto grado (7% ASC-H e 12% H-SIL). I campioni ASC-US con coinfezioni HR-HR all'analisi istologica sono risultati per il 55% CIN1 e per il 45% CIN2. Nei campioni istologici la frequenza delle coinfezioni è del 28% con variazioni statisticamente significative tra le varie lesioni (χ^2 , $p < 0,005$): le percentuali più alte sono rilevate nei CIN1 e CIN2 (34% e 41%), mentre risultano meno frequenti nei CIN3 (8%). Nessuna

coinfezione è stata rilevata nei carcinomi. Nei campioni citologici la categoria L-SIL risulta quella con la carica virale più elevata con una media di 273 ± 57 copie/cellula, mentre la carica più bassa risulta nei campioni negativi di controllo ($0,35 \pm 0,06$ copie/cellula). La carica virale diminuisce all'aumentare del grado di lesione istologica rilevata successivamente con prelievo biotico ($R^2 = 0,81$). Nei campioni istologici la carica virale più elevata è rilevata nelle lesioni CIN1 con una media di 669 ± 271 copie/cellula; essa diminuisce poi all'aumentare della lesione ($R^2 = 0,9562$). La carica rilevata nei carcinomi è paragonabile a quella rilevata nei campioni senza alterazioni (39 ± 13 vs 30 ± 8 copie/cellula). Le cariche misurate nei campioni istologici sono superiori di circa 100 volte rispetto a quelle misurate nei rispettivi campioni citologici, e direttamente correlate ($R^2=0,99$). Non risultano differenze statisticamente significative nel grado di integrazione virale tra le varie classi di lesione citologica, mentre aumenta significativamente nelle lesioni CIN2+ quando misurato nel campione biotico (t di Student, $p < 0,005$). Nei campioni citologici gradi di integrazione virale superiori al 50% sono associati significativamente a cariche inferiori a 1 copia/cellula (χ^2 , $p < 0,005$).

Conclusioni. Dai nostri dati emerge che: a) come atteso, la prevalenza dei genotipi ad alto rischio aumenta all'aumentare del grado di lesione sia citologica che istologica; b) rilevare le infezioni multiple HR-HR negli stadi precoci di alterazione citologica (ASC-US e L-SIL) è un fattore prognostico di lesione. Tale dato è confermato all'istologia dove le coinfezioni HR-HR aumentano all'aumentare della lesione, fino a CIN2. Da qui nasce l'importanza della genotipizzazione anche per le pazienti con lesioni di basso grado in quanto, se positive a infezioni multiple, risultano soggette a sviluppare lesioni precancerose; c) la rilevazione di basse cariche di HPV16 in campioni citologici con anomalie è indice di lesione istologiche gravi, dato confermato dalla diminuzione della carica al progredire della lesione istologica; d) la rilevazione contemporanea di una bassa carica di HPV 16 e di un elevato grado di integrazione virale è indice di lesione di alto grado. Da qui l'importanza di eseguire studi più approfonditi per confermare il valore prognostico di un'integrazione elevata ed una carica bassa tale da permetterne un'utilità nella selezione di donne con elevato rischio di progressione.

INTRODUZIONE

Il cancro alla cervice uterina (Cervical Cancer, CC) con circa 530.000 nuovi casi l'anno e 275.000 morti (Gillison *et al.*, 2014) rappresenta il secondo tipo di cancro per prevalenza nel mondo (Parkin and Bray, 2006) ed è il primo cancro ad essere riconosciuto dalla World Health Organization (WHO) come totalmente riconducibile ad un'infezione. Con circa 10-15 milioni di nuovi casi di infezione l'anno solo in Europa (Chiaradia *et al.*, 2007) l'infezione da Papillomavirus Umano (Human Papilloma Virus, HPV) rappresenta la malattia virale a trasmissione sessuale più comune nel tratto genitale (Markowitz *et al.*, 2007). Il cervicocarcinoma è un esito raro di un'infezione molto frequente (**Fig. 1**), ed ormai è ampiamente riconosciuto il ruolo cancerogeno dell'HPV identificato come fattore necessario, anche se non sufficiente, per lo sviluppo del cancro. Il DNA virale è individuato, infatti, in oltre il 99,7% dei casi di carcinoma cervicale (Walboomers *et al.*, 1999; Bosch *et al.*, 2002). Il Center for Disease Control and Prevention (CDC, 2013) ha stimato che il 50% dei nuovi casi di infezione/anno coinvolge i giovani di età compresa fra 15 e 24 anni, sebbene essi rappresentino solo il 25% della popolazione sessualmente attiva.

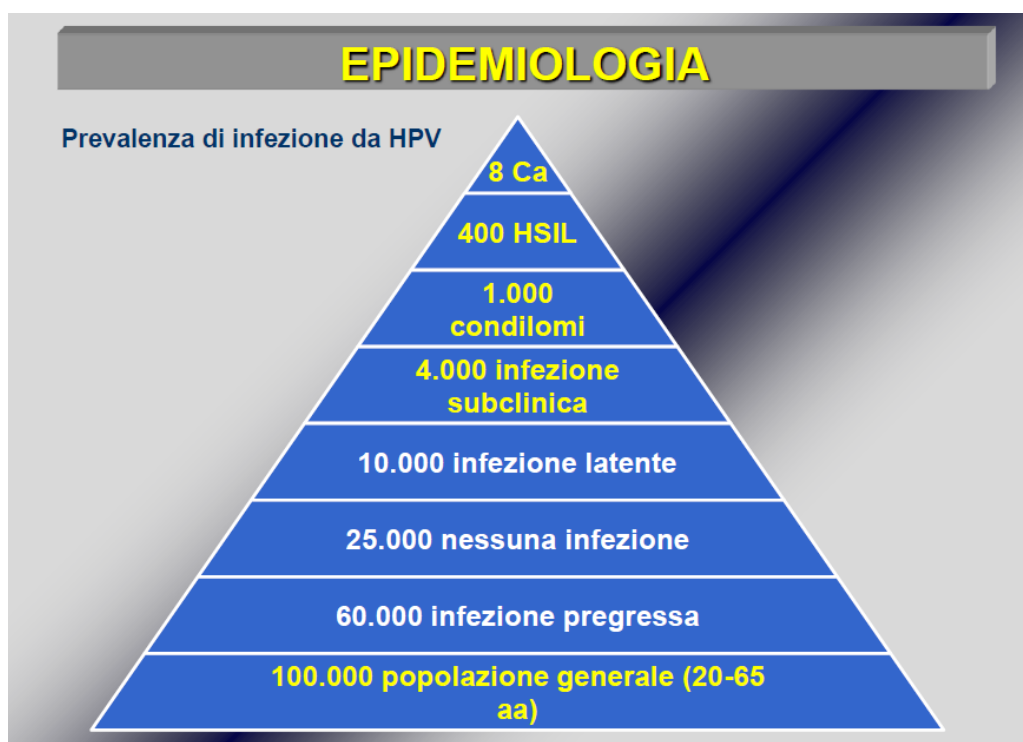


Figura 1. Prevalenza stimata dell'infezione genitale da HPV su una popolazione di 100.000 donne: di queste solo 400 hanno lesioni di alto grado e 8 sviluppano un carcinoma cervicale (Koutsky, 1997; Costa *et al.*, 2005; Ronco *et al.*, 2005).

Il rischio di infezione aumenta in caso di nuovo partner, come riportato in uno studio su giovani donne, in cui il 20% di quelle con un solo partner era infetto, contro il 55% di quelle che avevano avuto 4-5 partner (*Ley et al., 1991*). La riduzione di infezione osservata dopo i 30 anni non sembra legata ad un cambiamento delle abitudini sessuali quanto invece alla risposta immunitaria.

Come riportato ampiamente in letteratura, circa l'80% delle donne affette presenta un'infezione transitoria da HPV che regredisce spontaneamente entro 18-24 mesi, in particolare nelle donne più giovani. Nel restante 20% dei casi l'infezione può essere persistente; la persistenza dell'infezione è più frequente nelle donne di età più adulta/avanzata (*Castle et al., 2005; Costa et al., 2005*).

I PAPILLOMAVIRUS

L'ipotesi di una correlazione tra infezione genitale da HPV e neoplasia cervicale (*zur Hausen, 2009*) è stata formulata per la prima volta agli inizi degli anni '80 dal virologo tedesco Harold zur Hausen e confermata da numerose evidenze molecolari ed epidemiologiche nel corso degli anni successivi (*Bosch et al., 2002; Muñoz et al., 2004*).

I Papillomavirus sono piccoli virus specie-specifici appartenenti alla famiglia *Papilloviridae*, privi di envelope glicoproteico, con un capsido a geometria icosaedrica contenente una molecola di DNA circolare (**Fig. 2**) a doppio filamento di circa 8 kb (*zur Hausen, 2009*) e con uno spiccato tropismo mucoso genitale o cutaneo.

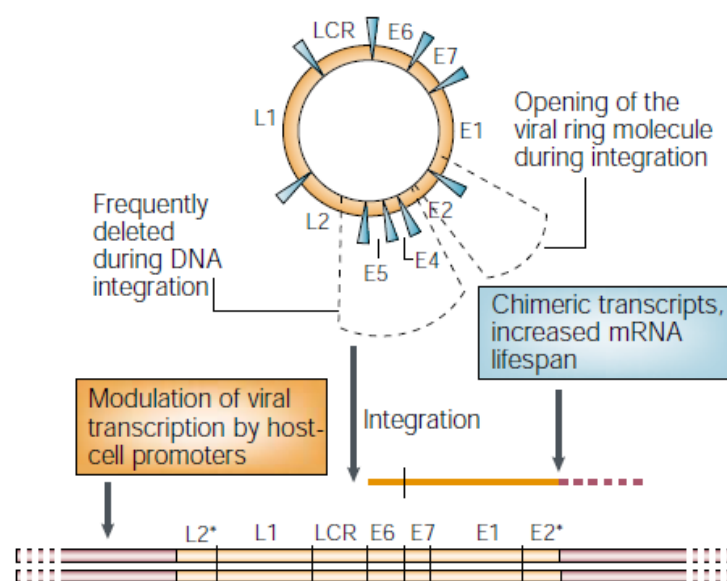


Figura 2. Organizzazione del DNA circolare di HPV e sua integrazione nel DNA della cellula ospite (zur Hausen, 2002).

Il genoma dell'HPV è costituito da geni espressi precocemente nel loro ciclo vitale (*Early*, E), coinvolti nei processi di regolazione del ciclo replicativo virale, e da geni tardivi (*Late*, L), che codificano per le proteine del capside:

- Tra i geni precoci (più del 50% di tutto il genoma): E1 e E2 sono coinvolti nella replicazione del DNA virale, nel mantenimento dello stato episomale e nella regolazione della trascrizione; E4 è coinvolto nella maturazione della particella virale; E5, E6 ed E7 sono coinvolti nei processi di trasformazione e di immortalizzazione cellulare;
- Tra i geni tardivi (circa il 40% del genoma virale): L2 codifica per la proteina capsidica minore mentre L1 per la proteina capsidica maggiore; quest'ultima è la regione target per la maggior parte delle metodiche molecolari di rilevazione e genotipizzazione del virus;
- La Long Control Region (LCR, circa 10% del genoma virale) è una regione non codificante di circa 850 bp che contiene l'origine della replicazione/trascrizione e rappresenta il target per il legame con molti fattori proteici.

CLASSIFICAZIONE FILOGENETICA DEI PAPILOMAVIRUS

Ciascun principale raggruppamento filogenetico (**Fig. 3**) è considerato un genere ed è identificato da una lettera greca per un totale di 16 generi (*de Villiers et al, 2004*).

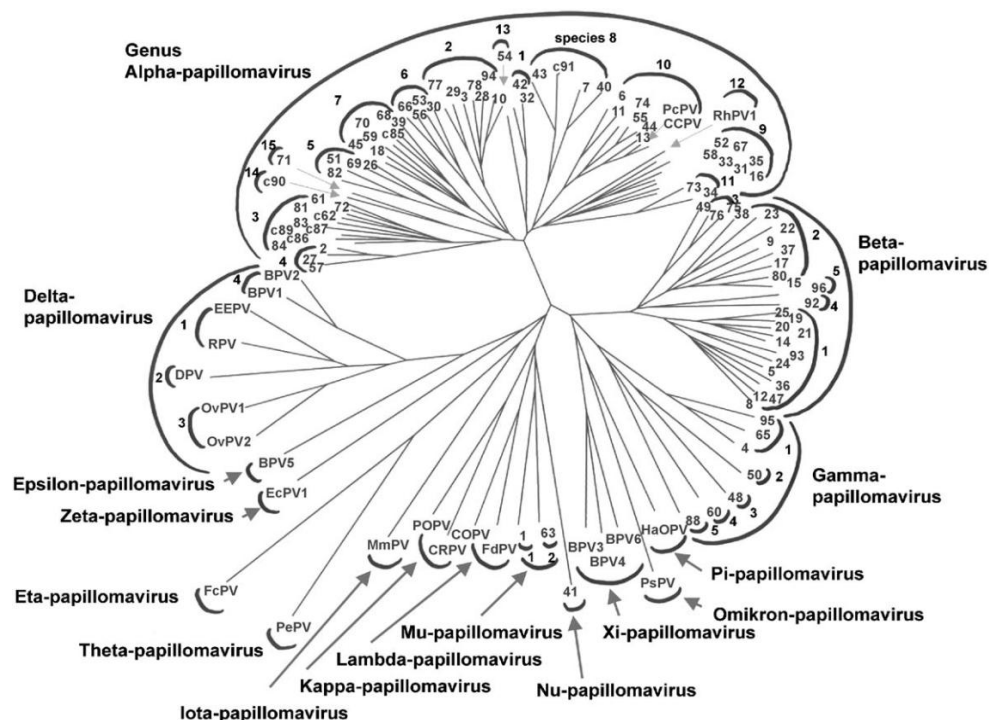


Figura 3. Classificazione filogenetica dei Papillomavirus (*de Villiers et al, 2004*).

L'ufficiale tassonomia dei Papillomavirus è basata sul confronto della sequenza nucleotidica del gene virale L1. Un genotipo di HPV si distingue rispetto ad un altro per sequenze nucleotidiche di L1 diverse per più del 10%. Ciascun genotipo di HPV è identificato da un numero. I tipi che differiscono per il gene L1 dal 2 al 10% sono rari e sono definiti "sottotipi" (*Calleja-Macias et al., 2005*). In presenza di differenze geniche di L1 inferiori al 2% i tipi si definiscono "varianti" (*Ho et al., 1991*). Nell'uomo sono stati descritti più di 120 tipi, di cui 40 di essi infettano la mucosa genitale e molti altri sono stati identificati in mammiferi ed uccelli. Gli HPV correlati filogeneticamente sono raggruppati in cluster; tra i principali ritroviamo: il gruppo A9 che comprende i genotipi 16-31-33-35-52-58; il gruppo A7 con i genotipi 18-39-45-59-68; il gruppo A5 con i genotipi 26-51-69-82; il gruppo A6 con gli HPV 53-56-66.

CLASSIFICAZIONE IN BASE AL RISCHIO ONCOGENO

I vari tipi di HPV attivi soprattutto a livello genitale sono classificati in tipi a basso e alto rischio oncogeno sulla base del rischio di sviluppare il cervicocarcinoma. *Muñoz e collaboratori (2003)* hanno stilato una classificazione epidemiologica dei tipi di HPV in base al rischio oncogeno sulla base dei dati ottenuti da 11 studi caso-controllo, condotti tra il 1985 e il 1997 in 9 paesi diversi, coinvolgendo 1.918 donne con carcinoma squamocellulare (Squamous-Cell Carcinoma, SCC) istologicamente confermato e 1.928 controlli. Tale classificazione è stata prodotta calcolando la prevalenza di uno specifico tipo di HPV nei pazienti e nei controlli. Tale classificazione ha identificato 15 tipi ad alto rischio oncogeno (HR-HPV = 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), 12 tipi a basso rischio oncogeno (LR-HPV = 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108) e tre tipi (26, 53, 66) a probabile alto rischio (IR-HPV) poiché rilevati in un terzo dei malati e in nessuno dei controlli (**Tab. 1**).

RISCHIO ONCOGENO	TIPI DI HPV
Alto rischio	16-18-31-33-35-39-45-51-52-56-58-59-68-73-82
Probabile alto rischio	26-53-66
Basso rischio	6-11-40-42-43-44-54-61-70-72-81-CP6108

Tabella 1. Classificazione in base al rischio oncogeno secondo Muñoz e collaboratori (2003).

Gli HR-HPV sono responsabili della maggior parte delle lesioni di alto grado e di oltre il 99,7% dei carcinomi (Walboomers *et al.*, 1999). Muñoz e collaboratori (2004) hanno dimostrato che l'HPV16 da solo è responsabile di oltre il 50% dei tumori invasivi mentre l'HPV16, l'HPV18 e la coinfezione HPV16/18 complessivi sono responsabili di oltre il 70% dei tumori invasivi e delle lesioni precancerose di tipo squamoso (Fig. 4).

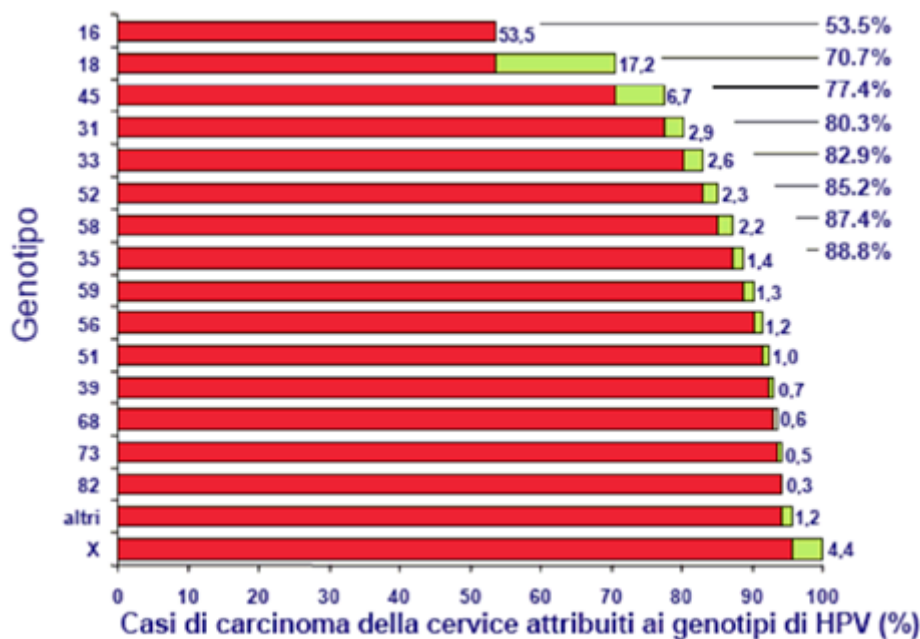


Figura 4. Genotipi più frequenti identificati nei tumori cervicali (Muñoz *et al.*, 2004).

I VACCINI HPV

Valutata la frequenza dell'infezione da HPV16 e 18 nelle lesioni di alto grado e la frequente rilevazione nei condilomi genitali degli HPV6 e 11, sono stati sviluppati dei vaccini verso questi genotipi. In Italia sono in commercio il vaccino bivalente (HPV16-18) **Cervarix®** (GlaxoSmithKline) e il vaccino quadrivalente (HPV6-11-16-18) **Gardasil®** (Sanofi Pasteur MSD). L'Italia è stato il primo Paese europeo a pianificare una strategia di vaccinazione pubblica contro il virus HPV, in particolare l'Agenzia per il Farmaco (AIFA) e il Consiglio Superiore di Sanità hanno ritenuto opportuno vaccinare gratuitamente tutte le ragazze al compimento dell'undicesimo anno di età. I vaccini verso l'HPV sono composti da involucri proteici vuoti denominati *virus-like particles*, associate a sostanze adiuvanti, che mimano la proteina capsidica virale L1, prodotti mediante la tecnologia del DNA ricombinante; non contengono alcun prodotto biologico vivente né DNA, per questo sono particelle virali non infettanti (Cutts *et al.*, 2007). L'efficacia del vaccino quadrivalente nel prevenire neoplasie cervicali e condilomi ano-genitali, valutata su una popolazione di

18.000 donne, è stata del 95-100% (Villa *et al.*, 2007); l'efficacia della forma bivalente si attesta anch'essa attorno al 90% (Cutts *et al.*, 2007). Sebbene una strategia di vaccinazione che abbia come target adolescenti non sessualmente attivi (*HPV-naive*) sia intuitivamente vantaggiosa, è probabile che le pazienti in attiva fase sessuale, alcune delle quali probabilmente già state esposte all'HPV, traggano vantaggi dalla vaccinazione, anche se questo resta da dimostrare (Villa *et al.*, 2007). Diversi studi in letteratura evidenziano per entrambi i vaccini alcune evidenze di cross-protezione contro l'HPV31 e l'HPV45, strettamente correlati ai tipi 16 e 18 (Cutts *et al.*, 2007). Il vaccino non protegge dalle lesioni pre-cancerose nelle donne che hanno già un'infezione causata dai tipi di HPV presenti nel vaccino. Rimangono ancora da valutare: a) le possibili variazioni dell'incidenza dei genotipi coinvolti nella vaccinazione e l'impatto sull'aumento di frequenza degli altri ceppi HR-HPV; b) il ruolo della vaccinazione nella copertura dal virus nella porzione di donne che non si sottopongono ai programmi di screening; c) la possibile efficacia dell'azione sinergica su altri genotipi HR-HPV in chi si sottopone a screening e vaccinazione. Da qui l'importanza degli studi epidemiologici nella fase di introduzione della vaccinazione.

IL CICLO VITALE DELL'HPV

Il ciclo vitale dell'HPV è strettamente correlato alla differenziazione delle cellule infettate dell'epitelio squamoso stratificato (**Fig. 5**). Nell'epitelio normale non infettato le uniche cellule che si dividono attivamente sono rappresentate dalle cellule localizzate negli strati basali e parabasali addossate alla membrana basale, e sono sia cellule staminali sia cellule dal ciclo vitale limitato denominate *cellule di amplificazione transitoria*. Queste ultime sono cellule proliferative in grado di subire una differenziazione terminale (Jones *et al.*, 2007). Non è chiaro quali cellule dello strato basale rappresentino il target per l'infezione da HPV, e non è da escludersi che entrambe le classi di cellule possano essere infettate. Se così fosse, è stato ipotizzato che l'infezione delle cellule staminali potrebbe portare ad un'infezione a lungo termine, mentre l'infezione delle cellule di amplificazione transitoria potrebbe portare ad un'infezione a breve termine. Riguardo questo specifico aspetto dell'infezione da HPV la questione rimane controversa, e necessita di ulteriori studi.

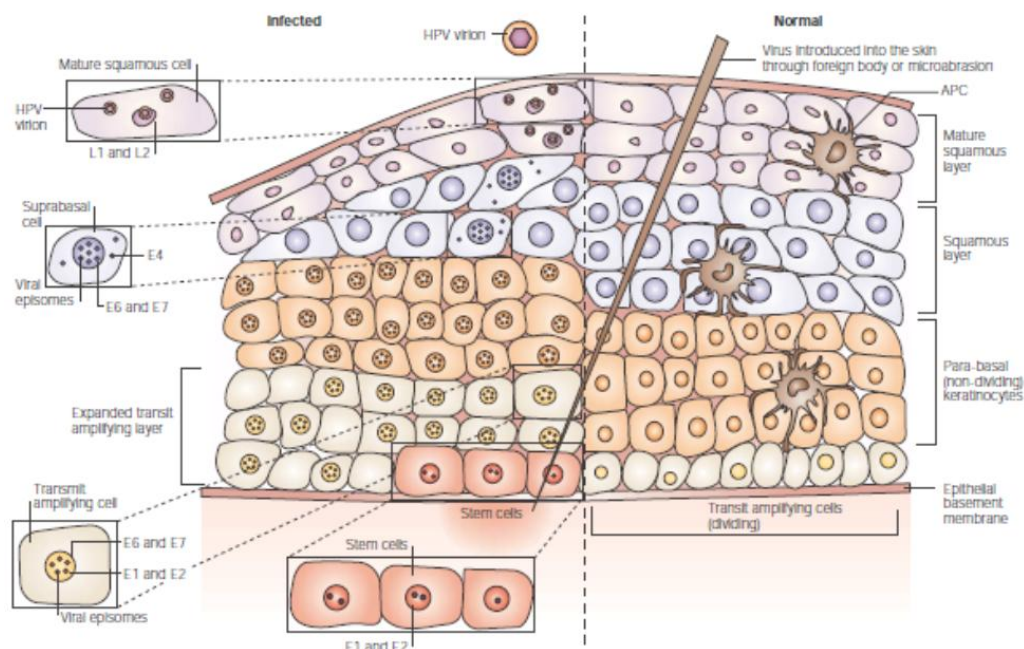


Figura 5. Espressione dei geni virali nella differenziazione delle cellule epiteliali (Frazer, 2004).

L'epitelio della mucosa genitale non è omogeneo e siti diversi possono essere il target per l'infezione da HPV; tuttavia gran parte dei tessuti cancerosi e pre-cancerosi si sviluppano in una particolare zona della cervice denominata "zona di transizione". Questa regione rappresenta il confine tra l'epitelio squamoso dell'ectocervice e l'epitelio colonnare dell'endocervice. Le cellule basali della zona di transizione conservano l'abilità di differenziarsi, una proprietà necessaria per la produzione dei virioni. E' possibile che queste cellule basali siano più facilmente accessibili all'infezione da HPV a causa della presenza di una quantità minore di strati sovrastanti, rispetto ad altri siti (Bodily e Laimins, 2011), oppure a causa dell'esposizione causata da micro-ferite (Kines et al., 2009). In seguito all'entrata (**Fig. 6**) e alla perdita del capsido, il genoma del virus viene replicato nel nucleo fino a 100 copie episomali per cellula. Nelle cellule non differenziate l'espressione delle proteine virali è estremamente bassa, e questo permette all'infezione di evadere dal controllo del sistema immunitario. In seguito a questa prima fase di stabilizzazione, il DNA virale viene replicato parallelamente alla replicazione del DNA della cellula ospite, e i genomi virali vengono distribuiti alle due cellule figlie. Affinché il genoma di HPV persista nelle cellule figlie, deve esistere un meccanismo attraverso il quale le copie episomali vengano mantenute nel nucleo e divise in maniera coordinata nelle cellule figlie durante la mitosi. In assenza di tale meccanismo, le copie extracromosomiali di HPV sarebbero perse durante la citocinesi. Il principale regolatore di questo processo è

rappresentato dalla proteina E2: essa infatti è in grado di legarsi sia alla cromatina mitotica sia al genoma virale, permettendo la trasmissione degli episomi durante la mitosi (*McBride et al., 2006*). Un'ulteriore funzione cruciale svolta da E2 è rappresentata dal mantenimento di un numero stabile di copie virali, attraverso un controllo sia positivo che negativo dei promotori dei geni precoci, regolando l'espressione di E6, E7, E1 e E2 stesso. Quando le cellule infette lasciano lo stato basale e vanno incontro alla differenziazione, viene indotta una massiccia sintesi di proteine virali; la limitazione di alti livelli di proteine virali agli strati cellulari altamente differenziati permette un ritardo nell'espressione degli antigeni virali, ed avviene in siti meno suscettibili alla sorveglianza del sistema immunitario (*Frazer, 2009*). Poiché il genoma virale non codifica per i propri enzimi di replicazione del DNA, è necessario che le proteine responsabili della replicazione della cellula ospite continuino ad essere espresse; a questo scopo il virus forza la cellula a rimanere nel ciclo cellulare principalmente attraverso l'azione di E7, in grado di inattivare le proteine appartenenti alla famiglia di pRb (retinoblastoma).

L'attivazione del promoter tardivo del virus in risposta alla differenziazione della cellula ospite avviene in vicinanza dello stato spinoso, ed è responsabile degli alti livelli di espressione delle proteine virali. In seguito alla differenziazione cellulare i livelli di trascrizione di E1, E2 ed E5 aumentano drasticamente, e conseguentemente il genoma virale viene amplificato fino a diverse migliaia di copie per cellula. In seguito a questa massiccia replicazione del genoma virale vengono prodotte le proteine capsidiche, L1 e L2, ed i virioni vengono assemblati. I virioni vengono riversati nell'ambiente esterno attraverso la desquamazione delle cellule in assenza di lisi o necrosi, e questo contribuisce ulteriormente alla persistenza del virus evitando una risposta di tipo infiammatorio (*Stanley, 2008*).

Il DNA virale può essere ritrovato nel materiale cervicale nella forma episomale, integrata o mista. Questo perché durante il ciclo vitale del virus può accadere l'evento di integrazione di parte del DNA virale nel genoma cellulare. L'integrazione virale avviene con la rottura del doppio filamento circolare di DNA a valle dei geni E6 ed E7, principalmente nella regione E2; ciò comporta la perdita del controllo a feedback negativo che ha la proteina E2 nei confronti delle proteine oncogene E6 ed E7. Da alcuni studi in letteratura risulta che i trascritti derivanti da integrazione siano più stabili e che tale evento risulti in un vantaggio selettivo di crescita da parte della cellula infettata a scapito del virus, che non potrà più replicarsi (*Woodman et al., 2007*).

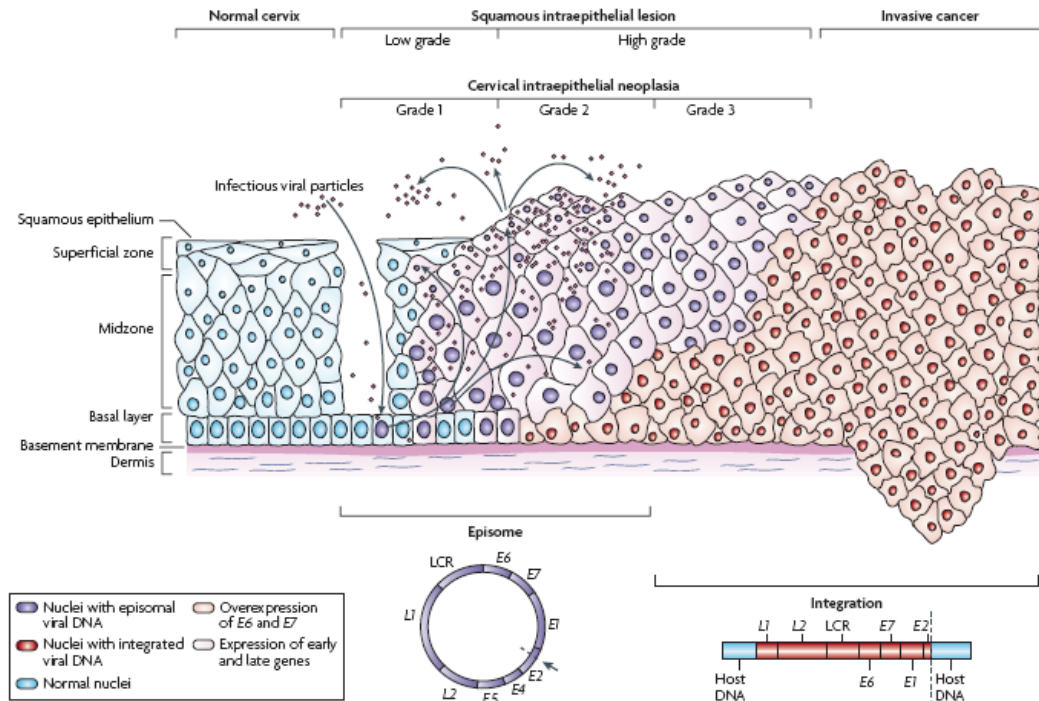


Figura 6. Ciclo vitale di HPV e sua correlazione con il differenziamento cellulare dell'epitelio infettato (Woodman et al., 2007).

LESIONI PRE-CANCEROSE QUALI PRECURSORI DEL CARCINOMA CERVICALE: DEFINIZIONE, CLASSIFICAZIONE ED EVOLUZIONE NELLA CARCINOGENESI

Come è noto, il carcinoma cervicale è preceduto da una fase pre-tumorale o pre-invasiva più o meno lunga, che può essere individuata mediante l'esame citologico delle cellule cervicali esfoliate (Pap test) e confermata mediante l'esame istologico (biopsia) di tessuto cervicale. Il modello oncogenetico, secondo cui il cervicocarcinoma si sviluppa progressivamente attraverso varie lesioni intraepiteliali definite "precursori", si basa su precise relazioni di ordine temporale, spaziale, morfologico, clinico e biologico tra i precursori stessi e il carcinoma. Le lesioni pre-tumorali, infatti, precedono lo sviluppo della neoplasia invasiva, sono adiacenti ad essa, presentano analogie cito-istologiche, gli stessi fattori di rischio, e hanno un progressivo potenziale di invasività (Syrijanen, 1997; Costa et al., 2005).

Le lesioni istologiche cervicali pre-tumorali sono definite Neoplasie Cervicali Intraepiteliali (CIN) e, in base allo spessore epiteliale interessato dagli elementi neoplastici, sono suddivise in 3 gradi (Buckley et al., 1982): CIN1 o displasia lieve (coinvolgimento del terzo inferiore dell'epitelio, con strati superficiali regolari), CIN2 o displasia moderata (coinvolgimento dei 2/3 inferiori dello spessore epiteliale), e CIN3,

comprendente la displasia severa e il carcinoma in situ (CIS) (distribuzione a tutto spessore delle atipie cellulari). Sulla base delle maggiori conoscenze acquisite sulla storia naturale della neoplasia, le CIN possono essere distinte in CIN1 da un lato e CIN2-3 dall'altro, secondo un modello dualistico basato sulle diverse potenzialità evolutive delle lesioni cervicali in senso tumorale (*Costa et al., 2005*).

Il sistema di refertazione e classificazione dei reperti citologici cervicali, analizzati al Pap test, attualmente in uso è il Sistema Bethesda del 2001 (*Solomon et al., 2002*). Tale classificazione tiene conto di tutti gli aspetti citologici, da quelli infiammatori e infettivi a quelli displastici e neoplastici, ed anche dell'adeguatezza del prelievo.

Sulla base del Sistema Bethesda i risultati sono raggruppati in:

- Normali.
- Infezioni.
- Lesioni reattive e riparative.
- Lesioni intraepiteliali squamose di basso grado (**L-SIL**): presenza di alterazioni delle cellule della cervice uterina di basso grado, che comprendono anche le atipie coilocitiche (modificazioni cellulari HPV correlate). Regrediscono nella maggior parte dei casi.
- Lesioni intraepiteliali squamose di alto grado (**H-SIL**): presenza di alterazioni delle cellule della cervice uterina di alto grado. Presentano un alto potenziale evolutivo verso il carcinoma invasivo, inversamente correlato alla possibilità di regressione.
- Cellule squamose atipiche (ASC) di significato indeterminato (**ASC-US**).
- Cellule squamose atipiche per cui non è possibile escludere H-SIL (**ASC-H**): diagnosi di incerta interpretazione che indica cellule atipiche a livello della superficie del collo dell'utero che non rientrano né nelle lesioni reattive né nelle lesioni classificate come L-SIL.
- Carcinoma squamo-cellulare (**SCC**).
- Adenocarcinoma endocervicale in situ, adenocarcinoma (**AIS**)
- Cellule ghiandolari atipiche (**AGC**), suggestive di neoplasia: sono diagnosi di incerta interpretazione che indicano cellule atipiche provenienti dall'interno dell'utero.

ASC-US, **L-SIL**, **ASC-H** e **H-SIL** sono considerate le lesioni potenzialmente pre-neoplastiche (**Fig. 7**).

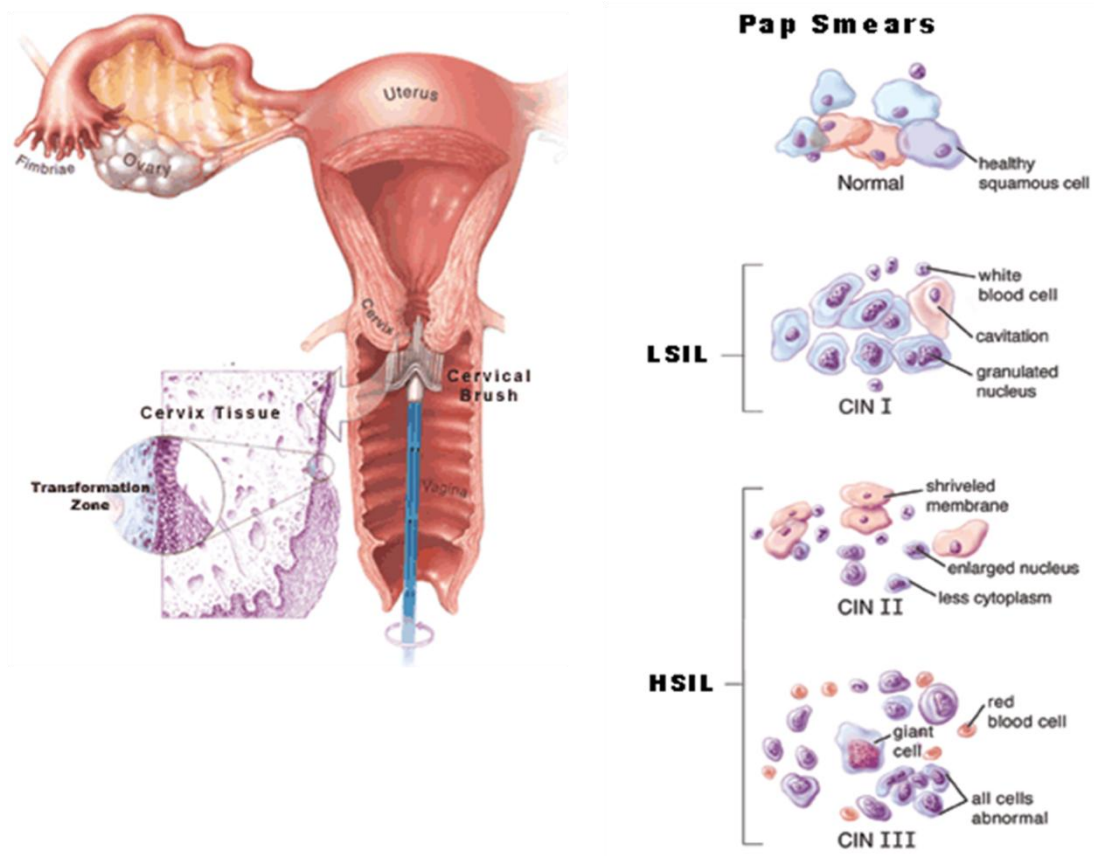


Figura 7. Sito del prelievo citologico e relative alterazioni rilevabili al Pap test e all'esame istologico.

L'evoluzione delle lesioni intraepiteliali prevede la progressione verso una lesione più grave o verso la neoplasia invasiva, la persistenza o la regressione verso la normalità o una lesione meno severa (Syrijanen, 1997). La maggior parte delle lesioni di basso grado sono transitorie e la percentuale di regressione diminuisce con l'aumentare della severità della lesione: 60% per la CIN1, 40% per la CIN2 e 33% per la CIN3. Al contrario, il tasso di progressione risulta minore per le lesioni di basso grado rispetto a quelle di alto grado, con tempi verosimilmente maggiori per queste ultime (**Tab. 2**).

	CIN1	CIN2	CIN3
REGRESSIONE A QUALSIASI GRADO	60%	40%	33%
PERSISTENZA	30%	40%	-
PROGRESSIONE A CIN3	10%	20%	-
PROGRESSIONE A CANCRO INVASIVO	1%	5%	12%

Tabella 2. Regressione, persistenza e progressione delle neoplasie intraepiteliali cervicali (adattata da Ostor et al., 1993).

I tassi di regressione alla normalità sono, invece, del 68,19%, 47,39% e 35,03% rispettivamente per ASC-US, L-SIL e H-SIL (**Tab. 3**).

a 24 mesi	ASC-US	L-SIL	H-SIL
REGRESSIONE VERSO NORMALE	68%	47%	35%
PROGRESSIONE A H-SIL	7%	21%	23%
PROGRESSIONE A CANCRO INVASIVO	0,25%	0,15%	1,44%

Tabella 3. Regressione e progressione delle lesioni squamose intraepiteliali (adattata da Melnikow et al., 1998).

È stato stimato che la neoplasia intraepiteliale cervicale richieda in media almeno 10 anni per diventare invasiva, con un intervallo di 3-15 anni in base alla gravità delle lesioni e all'età delle pazienti. Tale ipotesi è supportata dal fatto (*Costa et al., 2005*) che l'incidenza della CIN3 è maggiore in donne più giovani (età media 35 anni) di 10-15 anni di quelle con carcinoma invasivo (età media 50 anni).

DATI EPIDEMIOLOGICI RIGUARDANTI L'INFEZIONE DA HPV

Nonostante vari genotipi siano racchiusi nella stessa classe, è riconosciuto che ciascun genotipo ad alto rischio differisce enormemente dagli altri per il suo potere cancerogeno. Ad esempio è ben stabilito che circa il 70% dei tumori cervicali sono causati dai genotipi 16 (55-60%) e 18 (10-15%) (*Muñoz et al., 2004; Saslow et al., 2012*). Perciò i metodi di genotipizzazione nascono con lo scopo di stratificare il rischio tra i soggetti HPV-positivi e permettere un più adeguato protocollo di follow-up (*Guan et al., 2012*). La genotipizzazione ha un importante valore prognostico e il recente sviluppo di vaccini verso l'HPV la rende una metodica ancora più importante, poiché l'impatto e l'efficacia dei vaccini è fortemente condizionato dalla distribuzione territoriale dei genotipi virali (*Martin et al., 2011; Garcia-Espinosa et al., 2012*). Dagli studi in letteratura (*Martin et al., 2011; Guan et al., 2012*) emerge marcatamente che la percentuale di positività all'HPV aumenta all'aumentare della lesione citologica. In particolare i genotipi 16 e 18 spiccano tra i più frequenti con percentuali che si attestano rispettivamente sul 21,8-40,6% e sul 5,4-11,7% (*Kim et al., 2013; Zappacosta et al., 2009*) rispetto agli altri genotipi rilevati. Nell'ambito di uno screening primario la percentuale di positività globale si attesta sul 19,7-35,2% (*Kim et al., 2013; Zappacosta et al., 2009*) contro il 68,4% di positività riscontrata nelle pazienti sottoposte a screening secondario dopo alterazione al Pap test (*Wheeler et al., 2006*). All'interno della popolazione compresa nello screening secondario le percentuali di positività all'HPV test aumentano nelle varie alterazioni citologiche con percentuali pari al 18,2-29,8% nelle citologie negative, 52-84,5% negli ASC-US, 76-89,8% negli L-SIL, 63,2-90,9% negli ASC-H, 94-96,3% negli H-SIL (*Panatto et al., 2012; Mateos Lindemann et al., 2011; de Jonge et al., 2013; Guan et al., 2012; Martin et al., 2011*). Gli studi in letteratura che valutano la positività all'HPV test in campioni istologici, derivanti dall'invio a colposcopia di donne con rilevata alterazione al Pap test, indicano che la positività totale all'HPV si attesta sul 75-87%, con positività che variano tra il 59-73% CIN1, tra il 68-86% nelle lesioni CIN2, tra il 76-93% nei CIN3, fino al 89-97% nei carcinomi (*Guo et al., 2007; Guan et al., 2012*).

METODI DI PREVENZIONE DEL CANCRO DELLA CERVICE UTERINA

Tra tutti i tumori maligni il cancro cervicale è uno dei più efficientemente controllati da metodiche di screening. Il lungo intervallo tra la fase pre-neoplastica e la fase invasiva consente di effettuare un'efficace prevenzione tramite lo screening citologico (Pap test). Recentemente è emerso da alcuni studi che un'infezione da HPV16/18 può progredire verso CIN2/3 o cancro entro 36-120 mesi (*Winer et al., 2005; Khan et al., 2005*). In letteratura sono riportati casi di giovani donne che hanno sviluppato una neoplasia invasiva nonostante lo screening citologico negativo (*Anderson et al., 1992*). Pur considerando la possibilità di Pap test falsi negativi, è ragionevole ritenere che in alcune situazioni si verifichi una rapida progressione, dell'ordine di mesi e non di anni, da epitelio metaplasico immaturo a CIN3 e da questo a carcinoma invasivo, by-passando le fasi descritte nella storia naturale del cervicocarcinoma. Dunque, considerando l'intervallo medio di progressione tra SIL e carcinoma di 10-15 anni, una quota limitata di casi si colloca agli estremi della curva, per cui da un lato esisterebbero casi di neoplasia dopo i 65 anni d'età, dall'altro casi con decorso particolarmente rapido, addirittura nell'intervallo tra due Pap test (*Cuzick et al., 2008*). I casi di displasie a progressione rapida, HPV correlate, sono sostenuti da ceppi ad alto rischio oncogeno (in particolare HPV 16 e 18) e la rapidità di trasformazione dipende principalmente dalla persistenza dell'infezione virale, dall'integrazione del DNA virale nel genoma cellulare e dall'espressione degli oncogeni E6 ed E7.

SCREENING CERVICOVAGINALE: CONFRONTO FRA PAP TEST E TECNOLOGIE MOLECOLARI PER LA RICERCA DI HPV

Lo screening citologico a livello della popolazione effettuato mediante Pap test ogni 3-5 anni può ridurre l'incidenza di tumore cervicale dell'80% (*IARC, 2005*). Sebbene questo possa essere ritenuto un notevole successo, la citologia convenzionale evidenzia diverse problematiche (*Cox and Cuzick, 2006*):

- I risultati sono dipendenti dalla qualità del campione raccolto al prelievo.
- La lettura dei vetrini è molto soggettiva.
- La natura ripetitiva della lettura può dar vita ad un alto numero di errori interpretativi.

Tutto questo determina un'alta percentuale di falsi negativi con una sensibilità della citologia che oscilla fra il 30% e l'87% (*Fahey et al., 1995*).

Da uno studio (*Cuzick et al, 2003*) dove circa 11.000 donne aventi citologia borderline o positive ad HR-HPV con citologia negativa sono state sorvegliate per 12 mesi e sottoposte

in maniera random a colposcopia, citologia e HPV test, si evince una maggiore sensibilità dell'HPV test nel rilevare lesioni CIN2+ (97,1%) rispetto alla citologia convenzionale (76,6%). Un successivo studio di analisi dati (*Cuzick et al, 2006*) dove più di 60.000 donne sono state testate contemporaneamente sia con la citologia tradizionale che con la rilevazione del DNA dell'HPV mediante tecniche di biologia molecolare, ha ulteriormente confermato la maggiore sensibilità dell'HPV DNA test rispetto alla citologia, sebbene quest'ultima abbia una specificità maggiore (96,3% contro 90,7% con entrambe le percentuali che aumentano all'aumentare dell'età delle pazienti).

Dalle linee guida europee (*Arbyn et al, 2010*) emerge che la citologia convenzionale è tutt'ora la pietra miliare dei programmi di screening del cancro cervicale in Europa, anche se nuove prospettive per altre tipologie di screening si stanno sviluppando rapidamente. L'HPV DNA test è una di queste, ovvero la ricerca del DNA virale in campioni di pazienti, con diverse applicazioni:

- Triage delle donne con risultati citologici equivoci (ASC-US). L'uso dell'HPV DNA test per il triage di ASC-US è stato confermato avere una specificità maggiore rispetto alla citologia convenzionale (*Porras et al., 2012; Nygård et al., 2013*). Inoltre evidenze confermano come il risultato dell'HPV DNA test nel triage di ASC-US sia un ottimo fattore prognostico di lesioni CIN2+; infatti la sensibilità nel rilevare tali lesioni è del 97,2% con un Valore Predittivo Negativo (VPN) del 99,6% (*Ibáñez et al., 2012*).
- Follow-up delle donne trattate per CIN al fine di predire il successo o fallimento della terapia. Alcuni lavori in letteratura indicano come il risultato dell'HPV DNA test sia un ottimo fattore prognostico di evoluzione della malattia con un'incidenza di lesioni CIN2+ a tre anni da un HPV test negativo dell'1,8% (*Tropé et al., 2012*). Un altro lavoro (*Mesher et al., 2010*) sottolinea come dopo un follow-up di 5 anni le lesioni CIN2+ si sono manifestate nello 0,23% delle pazienti con HPV DNA test negativo, indicando un più lungo intervallo con basso rischio di sviluppo di lesioni CIN2+, in seguito a risultato negativo dell'HPV DNA test. Per questo lo screening con HPV DNA test aumenta il grado di prevenzione rispetto alla citologia convenzionale, aumentando l'intervallo di screening che può passare dai 3 anni della citologia ai 5 anni dell'HPV DNA test (*Ronco et al, 2013*).
- Screening primario in combinazione o meno con la citologia. L'International Agency for Research on Cancer (IARC) afferma che sufficienti evidenze mostrano come il test HPV per lo screening primario, usando un sistema validato, possa

essere efficace almeno tanto quanto lo è la citologia convenzionale (*IARC, 2005*). L'uso del test HPV in aggiunta alla citologia è confermato aumentare il tasso di rilevazione di CIN di alto grado e ciò porterebbe a prevenire più casi di cancro cervicale rispetto all'uso della sola citologia (*Cuzick et al., 2003*).

Il disaccordo fra le linee guida italiane ed americane riguarda il quesito: HPV DNA test da solo o co-test (HPV DNA test + Pap test)? Le linee guida americane (*Saslow et al., 2012*) affermano che, pur essendo disponibili in commercio diversi HPV test approvati dalla Food and Drug Administration (FDA), questi non siano approvati per lo screening primario senza l'utilizzo della citologia. Secondo tali linee guida l'aggiunta del test HPV alla citologia ha come risultato un aumento della rilevazione di lesioni CIN3 (*Naucner et al., 2007*); questo aumento di sensibilità con il co-test si traduce in un rischio minore in seguito a risultato negativo, permettendo un più lungo intervallo di screening. Se il tasso di incidenza del cancro cervicale rilevato con la citologia a 3 anni è accettabile, il co-test a intervalli di 5 anni fornisce gli stessi risultati, se non addirittura tassi di incidenza minori (*Dillner et al., 2008; Katki et al., 2011*). L'aggiunta dell'HPV test alla citologia aumenta anche l'identificazione delle donne con adenocarcinoma e precursori (*Anttila et al., 2010; Katki et al., 2011*), visto il trend in aumento degli adenocarcinomi sia in Europa (*Bray et al., 2005*) che negli USA (*Wang et al., 2004*). Inoltre il co-test permette la valutazione dell'adeguatezza del prelievo, fattore che con il solo HPV test è passato in secondo piano.

AUTOPRELIEVO QUALE STRUMENTO PER AUMENTARE LA COMPLIANCE DELLE PAZIENTI NELLO SCREENING CERVICOVAGINALE

Come precedentemente descritto, da recenti studi emerge come il test HPV sia più sensibile della citologia tradizionale nel rilevare lesioni CIN2+, conferendo una più lunga protezione in caso di risultato negativo e diminuendo i casi di overdiagnosi. Sebbene un aumento di sensibilità sia una proprietà importante nell'ambito di uno screening primario, il problema principale che affligge la prevenzione del cancro cervicale non riguarda le performance dei test ma il tasso di partecipazione ai protocolli di screening. In Italia più di due terzi della popolazione femminile tra i 25-64 anni è coperta da programmi di screening che invitano le donne al controllo ogni 3 anni; la *compliance*, però, è relativamente bassa con circa il 40% delle donne che aderiscono (*Giorgi Rossi et al., 2011*). La concordanza, per quanto riguarda la positività al test HPV, tra i due prelievi, auto-raccolti e medico-raccolti, è dell'86,7% in alcuni studi mentre in altri i livelli di concordanza sono insufficienti per poter definire i due metodi comparabili. Un punto sul quale vari studi concordano è l'aumento di rilevazione di HPV a basso rischio quando il campionamento è

effettuato con l'auto-prelievo. Alcuni di questi HPV hanno un tropismo relativo all'epitelio vaginale oltre che cervicale e quindi l'auto-prelievo raccoglie anche cellule epiteliali vaginali. Nello studio di *Gyllesten e collaboratori (2011)* gli autori valutano l'uso dell'HPV test ripetuto ad intervalli brevi, in cui il primo prelievo per il test HPV è effettuato con l'auto-prelievo. I risultati evidenziano che l'introduzione dell'auto-prelievo aumenta la *compliance* delle pazienti verso lo screening e che ripetere l'HPV test ad intervalli più brevi (6/12 mesi) permette di aumentare la specificità fino al 97,8%; inviare ad approfondimenti le donne con due HPV test positivi consecutivi porterebbe ad un notevole risparmio in termini economici.

SAGGI MOLECOLARI PER LA RICERCA E GENOTIPIZZAZIONE DELL'HPV

Numerosi sono i saggi molecolari per la ricerca e genotipizzazione dell'HPV con differenze in termini di sensibilità e specificità. I vari saggi differiscono per tipologia di metodica impiegata, per il numero di genotipi rilevati, per la possibilità di genotipizzazione, per la regione target rilevata (E1, E2, E6-E7, L1), per la presenza di controlli (controllo interno, controllo di cellularità) e non ultimo, per il grado di automazione. Gli aspetti fondamentali per rispondere ai requisiti di *Meijer e collaboratori (2009)* che il test molecolare "ottimale" deve soddisfare per garantire l'efficacia e la fattibilità dello screening primario della cervice uterina sono riassunti nei seguenti punti:

- Il test candidato non deve avere sensibilità clinica per le lesioni CIN2+ minore del 90% rispetto a quella dell'Hybrid Capture 2 HPV DNA Test (HC2), per le donne di età superiore ai 30 anni. Tale valore si traduce in un alto VPN e in un'alta rassicurazione per le pazienti.
- Il test deve avere una specificità clinica per lesioni CIN2+ non minore del 98% rispetto a quella dell'HC2, per le donne di età superiore ai 30 anni. Tale valore limiterebbe il numero dei test positivi che potrebbero inutilmente aumentare le procedure di sorveglianza con ricadute anche psicologiche per le pazienti.
- Il test deve assicurare una performance robusta e altamente affidabile, oltre che una buona riproducibilità intra e inter-laboratorio.

Attualmente i test in commercio per la rilevazione di acidi nucleici (DNA o RNA) di HPV sono essenzialmente di tre tipologie (**Tab. 4**):

- Saggi per la rilevazione di DNA di HPV ad alto rischio oncogeno, a media/alta processività.
- Saggi in PCR end-point per la rilevazione di DNA di HPV ad alto rischio oncogeno e genotipizzazione virale, a media/ridotta processività.

- Saggi per la rilevazione degli RNA messaggeri per le oncoproteine E6 ed E7.

Saggi per la rilevazione di DNA di HPV ad alto rischio oncogeno a media/alta processività

Il test più usato a livello mondiale, che rappresenta la pietra miliare degli studi su cui sono basati i requisiti di *Meijer e collaboratori (2009)* per lo screening primario, è l'**HC2** (Digene Corporation, Qiagen) approvato dalla FDA nel 2003 e marchiato CE-IVD (validazione europea per la diagnostica in vitro). Tale metodo si basa sull'ibridazione in fase liquida tra il DNA di HPV presente nel campione e due cocktail di sonde a RNA, di cui uno è specifico per 13 HR-HPV (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68), l'altro è specifico per 5 LR-HPV (HPV 6, 11, 42, 43, 44). L'ibrido DNA-RNA formatosi viene catturato su piastra mediante anticorpi specifici. Un secondo anticorpo anti-ibrido, marcato con fosfatasi alcalina con rivelazione chemiluminescente, ne consente la visualizzazione, emettendo una luce con intensità (misurata in "Relative Light Units" - RLU) direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione, e fornendo, dunque, una misura semiquantitativa della carica virale. L'HC2 è stato il primo test per la ricerca di HPV approvato dalla FDA. È un saggio di semplice esecuzione ed automatizzabile, che consente solo la distinzione tra HPV ad alto e a basso rischio oncogeno e non la genotipizzazione virale. Alcuni studi hanno riscontrato una possibile cross-reattività del cocktail per HR-HPV con altri genotipi non oncogenici non rappresentati nel pool di sonde, dando luogo a risultati falsi positivi che inficiano la specificità del test (*Castle et al., 2002*).

Un altro test molto usato per lo screening è il **Cervista HPV HR Test** (Cervista, Hologic), approvato dalla FDA nel 2009. Dal campione del paziente si estrae il DNA e si procede con l'amplificazione di sequenze di DNA virale con secondaria produzione di segnale fluorescente tramite due reazioni isotermiche. Il saggio rileva 14 HPV con tre diverse mix di sonde: mix A5/A6 (51-56-66); mix A7 (18-39-45-59-68); mix A9 (16-31-33-35-52-58). Presenta un controllo di cellularità, che ha come target il gene dell'istone 2 umano, per ogni mix producendo un segnale semiquantitativo del DNA cellulare presente nel campione e permettendo di valutare l'idoneità del prelievo (*Poljak e Kocjan, 2010*). La sensibilità analitica dichiarata è di 1.250-7.500 copie/reazione a seconda del genotipo. Il test **Cervista HPV16/18** (Cervista, Hologic) è un saggio usato per la genotipizzazione parziale limitata ai genotipi 16 e 18, usato come test riflesso dopo un risultato positivo con il metodo **Cervista HPV HR Test**. La sensibilità analitica è pari a 625-1.250 copie/reazione (corrispondenti a 62,5-125 copie/μl).

Un altro test usato è l'**Amplicor HPV Test** (Amplicor, Roche), lanciato sul mercato europeo nel 2004; è un saggio qualitativo basato sulla PCR disegnato per rilevare gli stessi 13 genotipi ad alto rischio oncogeno dell'HC2 (*Poljak e Kocjan, 2010*). I primer, utilizzati per l'amplificazione di una porzione del gene L1 dell'HPV e di una porzione del gene della β -globina umana, sono biotinilati, per permettere il legame degli eventuali amplificati con sonde oligonucleotidiche, verso HR-HPV e β -globina, immobilizzate in pozzetti di micro-piastre. Gli ibridi formati vengono rilevati con il saggio della perossidasi (*Poljak et al, 2005*).

Il test **RealTime High Risk HPV** (Abbott Molecular) è un saggio basato sulla Real-Time PCR, con primer modificati GP5+/GP6+ verso il gene L1, per lo screening e la simultanea genotipizzazione degli HPV16 e 18 in singolo e come pool di genotipi di 12 HR-HPV (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). Lanciato in Europa nel 2009 questo test usa 4 mix diverse con sonde fluorescenti specifiche per: il controllo della cellularità (β -globina), HPV16, HPV18 e per la rilevazione dei rimanenti genotipi ad alto rischio (*Poljak e Kocjan, 2010*). Le sensibilità dichiarate sono le seguenti: HPV 16-18-35-39-45-51-59-66-68 = 500 copie/saggio; HPV 31-33-52-56 = 2000 copie/saggio; HPV 58 = 5000 copie/saggio.

Anche il test **Cobas 4800 HPV** (Roche Molecular Diagnostic) è, come il precedente, un saggio che si basa sulla Real-Time PCR. È approvato dalla FDA e rileva simultaneamente con 4 differenti mix i genotipi degli HPV16 e 18 in singolo e come pool i genotipi: 31-33-35-39-45-51-52-56-58-59-66-68, usando primer PGMY che hanno come target una porzione del gene virale L1. Ha un controllo endogeno di cellularità grazie a primer diretti verso una regione di 330 bp del gene umano β -globina. Tale test si effettua su due strumentazioni che in maniera automatizzata estraggono, purificano e preparano il DNA dal campione introdotto e settano la reazione di PCR in micro-piastre. Dopodiché l'operatore trasferisce la micro-piastra in un termociclatore per la reazione di Real-Time PCR, che potrà essere seguita per ogni mix su 4 diversi canali di rilevazione (*Poljak e Kocjan, 2010*). La sensibilità dichiarata è: per gli HPV 33-39-51 = 0,3 copie/ μ l; HPV 16-18-31-58 = 0,6 copie/ μ l; HPV 66-68 = 1,2 copie/ μ l; HPV52 = 2,4 copie/ μ l.

Saggi PCR end-point per la rilevazione di DNA di HPV ad alto rischio oncogeno a media/ridotta processività

Nell'applicazione del test HPV ad uno screening secondario, cioè a casi che presentano alterazioni citologiche al Pap test, vengono spesso impiegati test che permettono un'ampia genotipizzazione e la valutazione di infezioni multiple. La maggioranza di questi test

presenti in commercio sono basati su metodica PCR end-point, con rivelazione dei genotipi attraverso tecniche diverse quali ibridazione su striscia a fase inversa (**Inno-LiPA**, **Linear Array**) o microarray (**Papillocheck**), permettendo la rivelazione anche di genotipi a rischio oncogeno basso ed intermedio (*Poljak e Kocjan, 2010*).

Saggi per la rilevazione degli RNA messaggeri per le oncoproteine E6 ed E7

Lo sviluppo di metodiche che valutano la presenza di mRNA è dovuto al fatto che, nel processo di cancerogenesi, l'over-espressione degli oncogeni virali E6 ed E7 è essenziale sia per l'inizio che per il mantenimento del fenotipo trasformato indotto dagli HR-HPV. La rilevazione dell'mRNA degli oncogeni E6/E7 potrebbe essere un marker migliore nel predire lo sviluppo di cancro rispetto alla rilevazione dell'HPV DNA (*Abreu et al., 2012*) e permettere di distinguere le infezioni transienti da quelle persistenti (*Clad et al., 2011*). Sono presenti due test in commercio basati sull'mRNA di E6/E7: il saggio **Aptima HPV** (Gen-Probe) e il **PreTect HPV-Proofer test** (Proofer, Norchip). Il primo test è un saggio qualitativo con amplificazione basata sulla sequenza di acidi nucleici (NASBA) e rileva senza genotipizzare l'mRNA di 14 HR-HPV (16-18-31-33-35-39-45-51-52-56-58-59-66-68); ha un controllo interno per verificare eventuali inibizioni, ma non ha un controllo di cellularità. La tecnica NASBA si basa sull'amplificazione isoterma del bersaglio ad RNA mediante l'impiego di 3 diversi enzimi: la trascrittasi inversa del virus della mieloblastosi aviaria (AMV *reverse transcriptase*), la T7 RNA polimerasi e la RNasi H. Il prodotto può essere rivelato mediante l'impiego di sonde specifiche marcate. Da alcuni lavori in letteratura emerge che la sensibilità è paragonabile a quella del test HC2, mentre la specificità è superiore (*Ratnam et al., 2011*).

L'altra metodica è un saggio qualitativo basato sulla metodica NASBA che rileva l'mRNA di 5 HR-HPV (16-18-31-33-35-45) permettendone la genotipizzazione; presenta un controllo di cellularità che ha come target il gene umano U1A. Studi in letteratura evidenziano la sua maggiore specificità rispetto al test Aptima e HC2, ma mostra una sensibilità minore nella rilevazione delle lesioni CIN2+ (*Ratnam et al., 2011*).

Il razionale alla base dello sviluppo dei test a mRNA è convincente, con un'ottima sensibilità e maggiore specificità. Tra i vari problemi da superare troviamo: la conservazione del campione (l'mRNA è molto instabile e il possibile utilizzo di tale metodiche in protocolli di screening richiede sistemi di raccolta efficienti per evitarne la degradazione); la gestione delle donne con test mRNA negativo ma HP DNA test positivo; la verifica derivante da studi longitudinali del Valore Predittivo Positivo (VPP) e VPN.

TEST	PRODUTTORE	TARGET	CERTIFICAZIONE	GENOTIPI RILEVATI	GENOTIPIZZAZIONE	TECNOLOGIA	SENSIBILITA' ANALITICA	CONTROLLO DI CELLULARITA'	CONTROLLO INTERNO
Digene Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test	Qiagen	Intero genoma	FDA/CE	13 HR-HPV	NO	IBRIDAZIONE	Dichiarata per l'HPV 16 pari a 100 copie/μl	NO	NO
Cobas HPV test	Roche	L1	FDA/CE	14 HR-HPV	PARZIALE (16 e 18)	RT-PCR	HPV 33-39-51 = 0,3 copie/μl. HPV 16-18-31-58 = 0,6 copie/μl. HPV 66-68 = 1,2 copie/μl. HPV 52 = 2,4 copie/μl.	SI	NO
CERVISTA HPV HR-Test	Hologic	L1	FDA/CE	14 HR-HPV	NO	IBRIDAZIONE	16-18-31-45-52-56 = 125-250 copie/μl ; 33-39-51-58-59-66-68 = 250-500 copie/μl; 35 = 500-750 copie/μl.	SI	NO
CERVISTA HPV 16/18 TEST	Hologic	L1	FDA	2 HR-HPV: 16-18	PARZIALE (16 e 18)	RT-PCR	62,5-125 copie/μl.	SI	NO
Amplicor HPV test	Roche	L1	CE	13 HR-HPV	NO	IBRIDAZIONE	HPV 16-18-33-35-39-45-51-56-68 = 0,1 copie/μl. HPV 31-52-58-59 = 0,24 copie/μl	SI	NO
Dx HR-HPV Auto Assay	BIO-RAD	E1/E6	CE	13 HR-HPV	NO	RT-PCR	HPV16 = 0,086 copie/μl	SI	SI
RealLine HPV High Risk Genotype Fla-Format	BIORON	L1	CE	12 HR-HPV	SI	RT-PCR	Non presente. Sensibilità clinica pari al 100%	SI	SI
Uterine Cervix Cancer of High-risk HPV Genotype Related Real-time PCR	LifeRiver	L1	CE	13 HR-HPV	SI	RT-PCR	5 copie/ μl	SI	NO

TEST	PRODUTTORE	TARGET	CERTIFICAZIONE	GENOTIPI RILEVATI	GENOTIPIZZAZIONE	TECNOLOGIA	SENSIBILITA' ANALITICA	CONTROLLO DI CELLULARITA'	CONTROLLO INTERNO
Abbott Real Time HR-HPV test	Abbott	L1	CE	14 HR-HPV	PARZIALE (16 e 18)	RT-PCR	HPV 16-18-35-39-45-51-59-66-68 = 500 copie/saggio. HPV 31-33-52-56 = 2000 copie/saggio. HPV 58 = 5000 copie/saggio..	SI	NO
Inno-LiPA	Innogenetics	L1	CE	27 HPV	SI	Ibridazione inversa su striscia	2-7 copie/µl.	SI	NO
LINEAR ARRAY HPV Genotyping test	Roche	L1	CE	38 HPV	SI	Ibridazione inversa su striscia	HPV 6-16-18-26-31-33-35-39-45-51-53-56-58-59-66-68-73-82 = 53-8089 copie/ml di prelievo	SI	NO
CLART HPV 2	Genomica	L1	CE	35 HPV	SI	microarray	10-100 copie/saggio	SI	NO
INFINITY HPV Assay	Autogenomics	E1	CE	26 HPV	SI	microarray	HPV 16 = 62,5-125 copie/saggio HPV 18 = 2.500-7.500 copie/saggio	NO	SI
HPV-QUAD Assay	Autogenomics	E1	CE	13 HR-HPV + 2 LR-HPV	SI	microarray	HPV 16 e 18 = 60-600 copie/µl.	SI	NO
PAPILLOCHECK HPV Screening Test	Greiner	E1	CE	24 HPV	SI	microarray	6-150 copie/µl	SI	SI
APTIMA HPV Assay	GenProbe	E6/E7 mRNA	FDA/CE	14 HR-HPV	NO	TMA	19-239 copie/reazione	NO	SI
PRETECT HPV-PROOFER	Norchip	E6/E7 mRNA	CE	5 HR-HPV: 16-18-31-33-45	SI	NASBA	0,1 nM- 10 nM	SI	NO

Tabella 4. Principali caratteristiche delle metodiche in commercio per la rilevazione e genotipizzazione dell'HPV.

HPV DNA test e HPV mRNA test a confronto

Il saggio HC2 è l'HPV DNA test più utilizzato nel mondo per individuare il DNA virale. La sua maggiore accuratezza rispetto alla citologia ripetuta nel triage di donne con ASC-US nell'individuare le lesioni CIN2+ è riconosciuta in diversi studi (*Cuzick et al., 2008; Arbyn et al., 2013*). Tuttavia, la sua specificità è minore di quella della citologia ripetuta nel triage dell'L-SIL per l'alta prevalenza dell'infezione da HPV (*Arbyn et al., 2005*). Restrungendo il suo uso nel triage dell'L-SIL alle donne di 35-60 anni, la sua specificità sembra invece aumentare raggiungendo in uno studio il 61% contro il 31% stimato nel gruppo d'età di 25-34 anni (*Ronco et al., 2007*), anche se in un altro studio non supera il 30% nelle donne di oltre 50 anni (*Castle et al., 2010*). La bassa specificità dell'HC2 nell'individuare le lesioni CIN2+ / CIN3+ nel triage di donne con citologia L-SIL rispetto alle donne con citologia ASC-US è confermata in una metanalisi (*Cuzick et al., 2008*), pur rimanendo molto alta (> 90%) la sensibilità del test (**Tab. 5**).

HC2			
APPLICAZIONE	OUTCOME	SENS	SPEC
TRIAGE ASC-US	CIN2+	93,1%	62,3%
	CIN3+	95,5%	60,5%
TRIAGE L-SIL	CIN2+	97,2%	30,6%
	CIN3+	97,1%	26,1%

Tabella 5. Metanalisi sulla performance dell'HC2 nel triage di donne con citologia ASC-US e L-SIL nell'individuare lesioni CIN2+/CIN3+ (adattata da Cuzick et al., 2008).

Il crescente interesse per le indagini molecolari ha portato vari autori a confrontare la performance dell'HPV DNA test e dei tipi di HPV mRNA test, valutandone l'accuratezza diagnostica nell'individuare le lesioni di alto grado.

Come emerge da una recente *review* sistematica (*Burger et al., 2011*), gli HPV mRNA test forniscono meno risultati falsi positivi dell'HPV DNA test, con conseguente maggiore specificità. Il PreTect HPV-Proofer/Easy Q presenta una specificità maggiore e una sensibilità più bassa dell'APTIMA, che sembra simile più all'HPV DNA test, probabilmente per il diverso “cocktail” di genotipi che identificano (**Tab. 6**).

	SENS	SPEC	VPP	VPN
PRETECT PROOFER/ EASY Q	41-86%	63-97%	50-94%	48-99%
APTIMA	90-95%	42-61%	32-40%	96-97%
HC2	70-100%	28-56%	28-91%	56-100%

Tabella 6. Accuratezza di HPV mRNA test (PreTect Proofer/Easy Q e Aptima) e HPV DNA test nell'identificare le lesioni di alto grado (adattato da Burger et al., 2011).

In una recentissima metanalisi è stata confrontata l'accuratezza del test APTIMA con quella di HC2 nell'individuare lesioni istologiche di alto grado nel triage di donne con citologia ASC-US o L-SIL. L'HPV mRNA test ha presentato (*Arbyn et al., 2013*) una sensibilità sovrapponibile a quella dell'HPV DNA test e una specificità sostanzialmente e significativamente maggiore per CIN2+ così come per CIN3+, in particolare nel triage dell'L-SIL (**Tab. 7**).

		APTIMA		HC2	
APPLICAZIONE	OUTCOME	SENS	SPEC	SENS	SPEC
TRIAGE ASC-US	CIN2+	95,7%	56,4%	93,8%	46,8%
	CIN3+	96,2%	54,9%	95,5%	44,9%
TRIAGE L-SIL	CIN2+	91%	42,5%	95,5%	28,6%
	CIN3+	96,7%	38,7%	98,8%	27,8%

Tabella 7. Sensibilità e specificità di APTIMA e HC2 nel triage di donne con citologia ASC-US e L-SIL nell'individuare lesioni CIN2+/CIN3+ (adattata da Arbyn et al., 2013).

VALUTAZIONE DELL'IMPORTANZA DI UN PRELIEVO IDONEO

La valutazione dell'idoneità del prelievo è il primo step della fase pre-analitica da determinare (Bianchi et al., 2013), in quanto un preparato non idoneo inficia il risultato ottenuto, indipendentemente dalla metodica di laboratorio impiegata. Numerosi sono i lavori che valutano l'idoneità di un prelievo cervicale effettuato per l'analisi citologica delle alterazioni delle cellule cervicali. I criteri di idoneità per il Pap test sono riportati nel Bethesda System 2001. Nel **Grafico 1** sono riportate le cause di inadeguatezza dei preparati citologici cervicali rilevate nella U.O. Anatomia Patologica dell'Azienda USL 3 di Pistoia, come definite dal Bethesda System 2001, con le relative frequenze. Le cause più frequenti di campioni inadeguati sono: infiammazione oscurante, bassa cellularità, scarsità di cellule squamose, assenza di cellule endocervicali, oscuramento da parte di globuli rossi, globuli bianchi e muco.

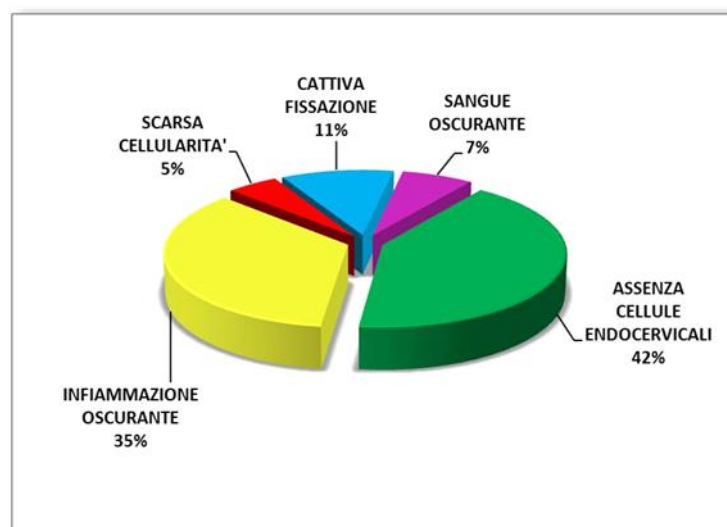


Grafico 1. Cause di inadeguatezza dei campioni cervicali rilevate nella U.O. Anatomia Patologica dell'Azienda USL 3 di Pistoia, come definite dal Bethesda System 2001.

L'idoneità del prelievo cervicale viene sempre valutata al microscopio ottico in sede di refertazione del Pap test. Le alterazioni citologiche che portano a tumore sono identificate in maniera predominante nelle cellule squamose dell'ectocervice, mentre i cambiamenti morfologici nelle cellule colonnari dell'endocervice sono valutati per lo screening dell'adenocarcinoma (tumore epiteliale che origina dall'epitelio ghiandolare), per questo l'adeguatezza di un campione citologico cervicale è definita dalla presenza di entrambe le popolazioni cellulari endo/ecto cervicali, indice del fatto che la zona di trasformazione è stata campionata (*Grundhoefer e Patterson, 2001*). Il Bethesda System 2001 a tal proposito definisce un numero minimo di cellule squamose ectocervicali, affinché il prelievo sia considerato idoneo. Per la citologia tradizionale (cytobrush strisciato direttamente su vetrino) il numero minimo di cellule richieste si attesta sulle 8.000-12.000, mentre scendono a 5.000 per la citologia su base liquida (ThinPrep, SurePath). Alcuni autori sostengono che questo valore di numerosità cellulare dovrebbe essere ulteriormente alzato: *Siebers e collaboratori (2012)* hanno misurato la cellularità di 60 campioni in Liquid-Based Cytology (LBC; 42 inadeguati e 16 adeguati alla lettura del pap-test) ed hanno osservato che 41/42 inadeguati contenevano meno di 20.000 cellule/ThinPrep mentre 17/18 casi adeguati presentavano una cellularità maggiore di 20.000 cellule/ThinPrep. Per quanto riguarda la presenza di cellule endocervicali/zona di trasformazione, il criterio numerico per la valutazione dell'idoneità è rimasto lo stesso dal Bethesda 1991, ovvero la presenza di almeno 10 cellule endocervicali/metaplastiche.

Con l'avvento di test molecolari per la ricerca dell'HPV l'idoneità del campione è passata in secondo piano. Da questo ne deriva che con i moderni saggi molecolari il vero problema sono i falsi negativi, problema che diventa di rilevanza fondamentale con l'inserimento del test HPV nella gestione degli screening di popolazione. Pochi sono i lavori presenti in letteratura sulla valutazione dell'idoneità del preparato nell'era molecolare (*Turrisi et al., 2013; Donati et al., 2013*).

Molti sono infatti i lavori in letteratura che valutano la carica virale, l'integrazione e la sensibilità analitica e clinica del test HPV, spesso riportando dati contrastanti fra di loro, ma praticamente inesistenti sono i lavori che valutano in maniera idonea la cellularità del campione. Non vengono riportati cut-off standardizzati e spesso quelli riportati non sono espressi come numero assoluto di cellule, ma come unità di misura relative alla metodica usata (*Bigras e de Marval, 2005; Boulet et al., 2009; Flores et al., 2007; Tsai et al., 2005; Carozzi et al., 2011*). Le stesse linee guida dei requisiti di un test HPV DNA per lo screening primario del cervicocarcinoma (*Meijer et al., 2009*) non menzionano niente riguardo l'idoneità del prelievo.

Le metodiche molecolari, prima di estrarre il DNA, prevedono una fase di pre-trattamento di lisi ed eliminazione di inibenti che dipendono dalla matrice del campione (cervicale o urine) e dall'entità del pellet di partenza. Non sono molti in letteratura i lavori che studiano come questa fase influenzi il dato analitico fornito. In letteratura esistono lavori che rilevano l'HPV a partire da 200-1000 µl di soluzione LBC (*Barbieri, 2012; Van Hamont et al., 2006; Park et al., 2012*) e lavori che effettuano una centrifugazione del campione con arricchimento del pellet per incrementare la sensibilità del test molecolare (*Boulet et al., 2009; Saunier et al., 2008*). *Keegan e collaboratori (2005)* dimostrano come l'utilizzo di diversi metodi estrattivi comporti una diversa capacità del test molecolare di rilevare il DNA di *C. trachomatis* (altro importante patogeno cervicale intracellulare), mentre *Peavor e collaboratori (2011)* raccomandano un approccio standardizzato all'HPV DNA test con una ottimizzazione della concentrazione iniziale di DNA, piuttosto che di volume di campione, per fornire un numero di inadeguati inferiore all'1% (percentuale adeguata per un efficace programma di screening). Tutta la fase pre-analitica richiede un'ottimizzazione e l'impiego di almeno due controlli: di estrazione/amplificazione e di cellularità. Praticamente inesistenti sono i metodi validati CE-IVD per la rivelazione di HPV, che rispondono ai requisiti di Meijer, che hanno entrambi i controlli, ad eccezione del test Abbott RealTime High Risk HPV (*Carozzi et al., 2011*).

INFEZIONI MULTIPLE DA PAPILLOMAVIRUS E POSSIBILE RUOLO COME MARKER DI PROGRESSIONE NEOPLASTICA

Tra le donne risultate positive al test HPV circa il 20-40% risulta positiva ad un'infezione multipla causata da più genotipi virali, acquisiti simultaneamente o in maniera successiva nei rapporti (*Schmitt et al., 2010*). La presenza di infezioni multiple viene generalmente associata con i medesimi fattori di rischio che riguardano l'acquisizione dell'infezione da HPV, quindi: numero di partner sessuali, comportamenti sessuali a rischio, consumo di sigarette; uso di contraccettivi orali e altri ancora (*Vaccarella et al., 2010*). La presenza di coinfezioni è riscontrata più frequentemente nelle pazienti di giovane età e tra quelle con Pap test alterati. Alcuni studi in letteratura suggeriscono un possibile ruolo delle infezioni multiple nello sviluppo e nella progressione delle neoplasie cervicali, mentre altri lavori evidenziano come il rischio di sviluppo di lesioni precancerose e di tumori invasivi nelle donne infette con più di un tipo di HPV non sia più alto di coloro che presentano un'infezione singola (*Trottier et al., 2006*). In letteratura si trovano lavori che evidenziano un'associazione tra presenza di infezioni multiple e lesioni di grado CIN2+. A causa della difficoltà nell'attribuire la lesione ad un particolare genotipo di HPV, in ogni caso, non è stato ancora dimostrato se l'associazione rilevata sia data dal semplice rischio aggiuntivo o da un'interazione sinergica tra i vari tipi di HPV (*Campos et al., 2011*). Secondo lo studio di *Liaw e collaboratori (2001)* l'infezione da HPV16 è associata con un rischio incrementato di acquisire infezioni multiple, mentre nel lavoro di *Chaturvedi e collaboratori (2005)* emerge che il gruppo A9 composto dai genotipi 16-31-33-35-52 e 58 sia significativamente meno coinvolto in infezioni multiple rispetto ai genotipi appartenenti ad altri gruppi; per il resto risulta che i tipi di HPV coinvolti in infezioni multiple non seguano una particolare logica di accoppiamenti. I risultati di questo studio mostrano anche che le coinfezioni comprendenti i genotipi 16 e 18 non sono associate a lesioni CIN2+, mentre lo sono le coinfezioni date da altri genotipi ad alto rischio oncogeno.

RUOLO DELLA CARICA VIRALE COME MARKER DI PROGRESSIONE NEOPLASTICA

L'incapacità di un singolo HR-HPV DNA test, come dell'esame citologico, di discriminare tra le infezioni persistenti e quelle transienti ha portato alla luce la necessità di avere dei parametri identificativi che permettano di stabilire quali donne abbiano un rischio maggiore di sviluppare lesioni di alto grado (*Manawapat et al., 2012*) e anche di ridurre il numero delle pazienti che sono soggette a follow-up non necessari dovuti a infezioni transienti (*Schmitt et al., 2013*). La carica virale è stata proposta come possibile candidato per ovviare sia a queste problematiche, con importanti risvolti clinici ed economici, sia per

discriminare le infezioni virali da trattare da quelle non clinicamente rilevanti. Le metodologie utilizzate per quantificare la carica virale hanno diversi livelli di specificità e sensibilità e la valutazione della performance della metodica spesso non è comprensibile (*Flores-Munguia et al., 2004*). Il sistema semi-quantitativo HC2 è uno tra i più usati per determinare la carica virale dell'HPV (*Bigras e de Marval, 2005; Flores et al., 2007*), sebbene non abbia la capacità di differenziare i vari genotipi; si usano anche metodiche basate sulla PCR che utilizzano un'analisi densitometrica per determinare la carica e associarla ai vari gradi di lesione (*Gravitt et al., 2007*). Tuttavia la metodica prevalentemente usata è la Real Time PCR quantitativa, in quanto ha il vantaggio di essere altamente specifica, riproducibile e in grado di rilevare la carica dell'HPV con un ampio range di ordini di grandezza (*Flores-Munguia et al., 2004*), sia con sonde Taqman (*Schmitt et al., 2013; Gravitt et al., 2003*) che con Sybr Green (*Manawapat et al., 2012; Cheung et al., 2009*).

Tuttora il ruolo della misurazione della carica virale in programmi di screening o nel management di pazienti con anomalie citologiche rimane non chiara (*Cheung et al., 2006*), nonostante i numerosi studi a riguardo, in parte anche dovuta alla non uniformità nell'espressione dei risultati. Alcuni di questi affermano come la carica virale aumenti in maniera statisticamente significativa tra chi ha lesioni e chi no (*Xi et al., 2011; Kovacic et al., 2006*), non prendendo in considerazione i vari gradi di lesione. Altri studi invece in maniera più specifica dichiarano che la carica aumenta in maniera statisticamente significativa all'aumentare della lesione citologica (*Gravitt et al., 2003; Saunier et al., 2008; Tabora et al., 2008*), non associandola però all'eventuale lesione istologica. Altri invece si concentrano solo sulle lesioni istologiche, affermando che la carica è più alta in maniera significativa solo nei carcinomi (*Boulet et al., 2009*); oppure che la carica discrimina le lesioni CIN2+ (*Flores et al., 2007*). Secondo lo studio di *Saunier e collaboratori (2008)* la carica correla in maniera statisticamente significativa con la lesione citologica ma non con la lesione istologica, mentre secondo *Tsai e collaboratori (2005)* la carica correla con la lesioni istologica fino al grado CIN2 per poi diminuire nei CIN3.

Gli studi spesso prendono in considerazione genotipi raggruppati (*Schmitt et al., 2013; Flores et al., 2007*), altri invece non normalizzano la carica virale per la cellularità del campione (*Bigras e de Marval, 2005; Flores et al., 2007; Kovacic et al., 2006; Tsai et al., 2005*). La normalizzazione della carica con un gene umano, per standardizzare le variazioni dovute alla cellularità del campione, è importante per un'accurata interpretazione dell'associazione tra carica e lesione (*Cheung et al., 2009*), permettendo di

calcolare la vera carica virale su cellula ed eliminando le fluttuazioni dovute alle variazioni nel numero di cellule tra campioni diversi e tra intervalli di tempo diversi per campioni dello stesso paziente (*Schlecht et al., 2003*). Molto spesso negli studi in cui la carica virale viene normalizzata per la cellularità del campione uno standard a concentrazione nota è usato a diluizioni scalari per costruire una retta di taratura sulla quale calcolare la cellularità (*Manawapat et al., 2012; Cheung et al., 2009*), ma questo può portare ad errori come l'inaccurata misurazione della concentrazione di DNA, errori di manualità e pipettamento nell'allestire differenti curve di calibrazione. Secondo *Roberts e collaboratori (2008)* piccoli errori nella quantificazione o nel dispensare il DNA si possono tradurre in ampie over-under estimazioni della carica virale. Per questo nello studio in questione viene usato per la quantificazione un plasmide contenente i geni virali E2 ed E6 e il gene umano Hydroxy Methyl Bilane Synthase (HMBS) in rapporto 1:1:1 per un'unica curva di calibrazione dei tre geni, riducendo errori di manualità.

Alcuni degli studi in cui non vi è normalizzazione della carica virale per la cellularità del campione riscontrano una correlazione statisticamente significativa tra la carica e il grado di lesione (*Flores et al., 2007; Kovacic et al., 2006; Tsai et al., 2005; Xu et al., 2009*); altri evidenziano come la carica virale assoluta correli con la lesione, ma una volta che la carica viene normalizzata la significatività statistica della correlazione viene persa (*Cheung et al., 2009; Cheung et al., 2006*). L'osservazione di una carica virale assoluta che aumenta all'aumentare della lesione può essere spiegata dal fatto che le cellule anormali esprimono meno molecole di adesione cellulare, rispetto alle cellule normali, e vengono per questo maggiormente esfoliate (*Cheung et al., 2009; Schlecht et al., 2003; Constandinou-Williams et al., 2010*). Nello studio di *Swan e collaboratori (1999)* si evidenzia come la quantità di DNA cellulare vari ampiamente tra i vari campioni citologici, con un aumento statisticamente significativo delle cellule all'aumentare del grado di lesione.

Nonostante la normalizzazione della carica virale per la cellularità del campione sia uno step fondamentale per avere dei dati più accurati sul valore clinico della carica, non è possibile distinguere le cellule infettate da quelle non infettate in un campione cervicale. È inevitabile che ogni campione abbia una quota di cellule infette e una quota di cellule non infette e irrilevanti dal punto di vista clinico (*Cheung et al., 2009*).

Alcuni lavori evidenziano la correlazione tra carica virale e lesione in base al genotipo di HPV infettante: pare infatti, ad esempio, che la carica virale nell'infezione da HPV18 non sia correlata alla lesione, mentre per tale genotipo sembra più importante l'evento di integrazione per l'evolversi verso lesioni di alto grado (*Constandinou-Williams et al.,*

2010). Nello studio di *Ramanakumar e collaboratori (2010)* si sottolinea come alte cariche di HPV16 e 18 correlino con la persistenza della lesione, mentre per i genotipi 31 e 45 tale correlazione non è statisticamente significativa. Secondo lo studio di *Constandinou-Williams e collaboratori (2010)* la carica virale non risulta essere un buon marker in quanto tende ad aumentare e diminuire nel corso dell'infezione, perciò è impossibile con una sola misurazione voler predire l'evoluzione della patologia, infatti ad una iniziale alta carica può seguire una bassa carica e viceversa. Sebbene in questo studio si scelga la più alta carica tra misurazioni successive (follow-up a sei mesi) anch'essa non distingue coloro che sviluppano lesioni o meno. Inoltre il sostanziale overlap di cariche tra coloro che sviluppano lesioni e coloro che non le sviluppano evidenzia i motivi per i quali ancora non esista ancora un cut-off clinicamente utile per la carica (*Manawapat et al., 2012; Constandinou-Williams et al., 2010*).

CARICA VIRALE ED INFEZIONI MULTIPLE

Nello studio di *Xi e collaboratori (2009)* è stata osservata un'associazione tra bassi livelli di carica per l'HPV16 e 18 e la coinfezione con altri genotipi: in particolare la coinfezione dell'HPV16 con genotipi del gruppo A9 (16-31-33-35-52-58-67) e la coinfezione dell'HPV18 con i genotipi del gruppo A7 (18-39-45-59-68-70-85). Anche nello studio di *Liaw e collaboratori (2001)* si afferma che il rischio di acquisire un nuovo tipo di HPV in donne già infette è maggiore rispetto a coloro che sono HPV negative, sebbene l'aumento non si rilevi per i genotipi appartenenti agli stessi gruppi, ad esempio coinfezione HPV 16 con genotipo gruppo A9. Il meccanismo che sta alla base della riduzione coinfezione-correlata non è chiaro, anche se una possibile ipotesi potrebbe essere che se più genotipi virali sono presenti nella stessa cellula possono competere per il complesso replicativo, trascrizionale e traduzionale della cellula infettata. Un'altra ipotesi suggerita da *Combati e collaboratori (2002)* riguarda la probabile condivisione di proprietà biologiche simili tra genotipi appartenenti al solito gruppo che si potrebbero tradurre in simili epitopi scatenando una risposta immunitaria cross-reattiva.

Contrariamente a tutto ciò lo studio di *Weissenborn e collaboratori (2003)* afferma che le pazienti infette con più di uno dei genotipi ad alto rischio investigati nello studio (16-18-31-33-45-56) hanno cariche virali significativamente più alte. In particolare si nota come la media della carica virale dell'HPV16 rilevata nelle lesioni H-SIL con più di un genotipo sia 4 volte più alta di quella rilevata in lesioni H-SIL con il solo HPV16 infettante.

La trasmissione sequenziale di vari HPV da parte dello stesso partner non può essere esclusa, ma pare alquanto improbabile. Un'interpretazione alternativa potrebbe essere che

più genotipi sono trasmessi simultaneamente e la loro rilevazione sequenziale è una conseguenza di cicli replicativi indipendenti che sono asincroni e solo occasionalmente si sovrappongono (*Woodman et al., 2007*). I virus con una apparente assenza di attività biologica possono nascondere una latenza nel ciclo virale con conseguente evasione dal sistema immunitario (*Schmitt et al., 2010*). In aggiunta, è ancora ignoto se questi virus sono presenti nella stessa cellula e se sono biologicamente attivi ed anche i valori della carica virale sono sconosciuti, in quanto sono pressoché assenti gli studi che confrontino le cariche virali dei genotipi presenti in coinfezione e la loro evoluzione parallelamente allo sviluppo delle lesioni.

RUOLO DEL GRADO DI INTEGRAZIONE DEL DNA VIRALE NEL GENOMA OSPITE COME MARKER DI PROGRESSIONE NEOPLASTICA

Circa il 90% delle infezioni da Papillomavirus regredisce spontaneamente, indicando come siano necessari altri eventi per la progressione neoplastica (*Arias-Pulido et al., 2006*). L'integrazione nel genoma ospite è considerato uno step critico nella carcinogenesi, in quanto promuove la trascrizione degli oncogeni virali E6 ed E7. Questo accade mediante la delezione del gene E2 la cui proteina codificata non potrà più svolgere la funzione di repressore della trascrizione degli oncogeni virali E6 ed E7, che verranno espressi in maniera non più controllata. L'evento di integrazione è associato alla trasformazione e immortalizzazione delle cellule infette, conferendo un vantaggio selettivo di crescita a tali cellule (*Guo et al., 2007*). Nelle cellule post-mitotiche soprabasali gli oncogeni virali E6 ed E7 inducono un non programmato rientro nella fase S del ciclo cellulare con la conseguente riattivazione del macchinario replicativo della cellula ospite necessario per l'amplificazione del genoma virale e conseguente produzione di nuovi virus. In questa tipologia di infezioni "produttive" l'espressione degli oncogeni virali non risulta in una vera minaccia cancerogena, poiché l'espressione avviene in un comparto di cellule destinate ad essere perse dall'epitelio squamoso cervicale (che subisce un continuo rinnovamento). La progressione neoplastica cervicale richiede una de-regolazione "spaziale" e "quantitativa" di questo potente controllo trascrizionale mediato dalla proteina E2, affinché alti livelli di oncogeni virali siano espressi in tutto l'epitelio. L'espressione delle proteine E6 ed E7 nelle cellule epiteliali basali inibisce la differenziazione cellulare e induce alti livelli di instabilità cromosomica che guida la progressione verso il fenotipo maligno (*Pett and Coleman, 2007*).

La proteina E6 degli HPV ad alto rischio è una proteina di circa 150 aminoacidi che funziona principalmente come "ponte" per un gran numero di fattori cellulari, e che manca

completamente di attività enzimatica (*Howie et al., 2009*). E6 lega l'ubiquitina ligasi E6AP che recluta p53 in un complesso trimerico, inducendo la sua ubiquitinazione ed un rapido turnover. p53 non è il naturale substrato di E6AP e viene soltanto legato in presenza di E6. Anche E6 degli HPV a basso rischio lega E6AP, ma questo complesso non porta alla degradazione di p53. E6 è in grado di inattivare p53 anche attraverso il legame con le due istone acetil-trasferasi CBP/p300 e ADA3, portando ad una ridotta acetilazione di p53. Di notevole interesse è il fatto che mutanti di E6 che non sono in grado di abrogare la funzione di p53 sono comunque in grado di immortalizzare le cellule, indicando dunque che altre attività di E6 sono comunque importanti. Le proteine E6 degli HPV ad alto rischio attivano l'espressione di hTERT (trascrittasi inversa della telomerasi), mentre le proteine E6 degli HPV a basso rischio non possiedono questa proprietà.

La proteina E7 degli HPV ad alto rischio lega le proteine p150 (pRb), p107 e p130 con un'affinità significativamente più alta rispetto alla sua controparte degli HPV a basso rischio. Questo legame comporta la repressione del fattore di trascrizione E2F che controlla l'espressione di molti geni specifici della fase S del ciclo cellulare, ed una conseguente entrata della cellula nella fase replicativa. L'abrogazione della funzionalità di pRb attraverso il legame con E7 è un importante meccanismo attraverso il quale viene mantenuta la capacità replicativa anche durante la differenziazione cellulare. La proteina E7 degli HPV ad alto rischio induce inoltre la degradazione di pRb inattivando completamente la sua funzione. E7 è anche in grado di legare gli inibitori della ciclina chinasi p21 e p27, interferendo con la loro funzione inibitoria sul ciclo cellulare, e le cicline A ed E aumentando la loro attività. Una conseguenza di questa efficiente abrogazione di pRb da parte di E7 consiste nell'aumento di instabilità della proteina p53, che potrebbe condurre la cellula verso l'apoptosi.

L'immortalizzazione di cellule di topo trattate con le proteine E6 ed E7 non comporta lo sviluppo di un tumore; quest'osservazione dimostra che l'infezione da HPV è necessaria ma non sufficiente per la progressione maligna. Per una completa trasformazione è necessaria l'introduzione di nuove mutazioni e l'attivazione di oncogeni secondari. E6 ed E7 stessi contribuiscono all'accumulo di mutazioni nel genoma cellulare attraverso la promozione di una instabilità genomica durante un'infezione persistente. E6 ed E7, ad esempio, inducono anomalie centrosomiche che comportano un'anormale segregazione dei cromosomi e aneuploidie. Quale sia il vantaggio che il virus guadagna attraverso la promozione di questa instabilità genomica cellulare non è chiaro, ma sembrerebbe essere un semplice effetto collaterale dell'inattivazione dei pathways di sorveglianza sul ciclo

cellulare svolto da p53 e da pRb (*Bodily and Laimins, 2011*). Con l'integrazione del DNA virale nel genoma ospite si ha una minore produzione della proteina E2, ma anche della proteina E1, che hanno un forte potere immunogeno e vengono presentate al sistema immunitario favorendo l'eliminazione delle cellule infette. L'espressione degli oncogeni virali E6 ed E7, invece, sembra essere fortemente tollerata dal sistema immunitario (*Manawapat et al., 2012*).

Molti studi associano l'evento di integrazione alla progressione della carcinogenesi, rilevando un'associazione tra grado di integrazione e gravità della lesione istologica (*Peitsaro et al., 2002; Zhang et al., 2010*) e citologica (*Saunier et al., 2008*). In alcuni studi le differenze nei gradi di integrazione sono significative solo tra carcinomi e non (*Boulet et al., 2006; Saunier et al., 2008; Guo et al., 2007*); in altri studi risulta che l'integrazione non correla con la gravità della lesione (*Cheung et al., 2009; Azizi et al., 2008*). L'integrazione veniva definita fino a qualche anno fa un evento tardivo nella patogenesi virale, opinione confutata dai dati che mostrano gradi di integrazione rilevabili anche nei CIN di basso grado e nei campioni con citologia normale (*Woodman et al., 2007; Chan et al., 2007; Cheung et al., 2008*).

SCOPO DELLA TESI

Gli scopi di questa tesi sono stati:

- Valutare sensibilità, specificità e concordanza nei risultati tra vari metodi di genotipizzazione del virus HPV presenti in commercio, che usano tecniche di amplificazione di DNA e successiva rivelazione mediante ibridazione inversa su striscia o su macroarray, ed anche di metodiche di rilevazione e genotipizzazione in RealTime PCR. Questa fase è stata fondamentale per poter rielaborare i dati ottenuti con metodiche diverse nell'ampio arco temporale di raccolta dei casi e dei dati.
- Valutare il possibile ruolo prognostico di markers diversi dalla semplice negatività/positività ai virus HR-HPV nell'ambito dei protocolli di screening del carcinoma della cervice uterina, per una migliore gestione dei casi positivi. In particolare sono stati analizzati i seguenti marcatori:
 - ✓ La determinazione del **genotipo**. Evidenze scientifiche dimostrano che l'evoluzione verso lesioni CIN2+ sia maggiore con infezioni persistenti da HR-HPV, quindi conoscere il genotipo può migliorare il percorso di trattamento della paziente. Conoscere l'incidenza dei genotipi nella popolazione può ricoprire un ruolo fondamentale per quanto riguarda la preparazione di vaccini profilattici, che potrebbero variare la loro multivalenza in base ai genotipi più frequenti in quel dato territorio;
 - ✓ La presenza di **infezioni multiple**. Alcuni studi in letteratura suggeriscono un possibile ruolo delle infezioni multiple nello sviluppo e nella progressione delle neoplasie cervicali, mentre altri lavori evidenziano come il rischio di sviluppo di lesioni precancerose e di tumori invasivi nelle donne infette con più di un tipo di HPV non sia più alto di coloro che presentano un'infezione singola (*Trottier et al., 2006*). A causa della difficoltà nell'attribuire la lesione ad un particolare genotipo di HPV, in ogni caso, non è stato ancora dimostrato se l'associazione rilevata sia data dal semplice rischio aggiuntivo o da un'interazione sinergica tra i vari tipi di HPV (*Campos et al., 2011*).
 - ✓ La **carica virale** (limitatamente all'HPV16). Tuttora il ruolo della misurazione della carica virale in programmi di screening o nel

management di pazienti con anomalie citologiche rimane non chiara (Cheung *et al.*, 2006), nonostante i numerosi studi a riguardo.

- ✓ Il **grado di integrazione** virale (limitatamente all'HPV16). Molti studi associano l'evento di integrazione alla progressione della carcinogenesi, rilevando un'associazione tra grado di integrazione e gravità della lesione istologica (Peitsaro *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2010) e citologica (Saunier *et al.*, 2008). Tuttavia il ruolo del processo di integrazione del genoma virale nel genoma della cellula ospite è ad oggi poco chiaro, in quanto in diversi altri studi non viene rilevata alcuna correlazione con la gravità della lesione (Cheung *et al.*, 2009; Azizi *et al.*, 2008).

MATERIALI E METODI

POPOLAZIONI DI STUDIO

Nel nostro studio il test HPV viene eseguito come test di secondo livello, ovvero sulle pazienti con precedenti alterazioni al Pap test e su coloro che partecipano al follow-up dopo intervento di conizzazione. Sono state analizzate preliminarmente due popolazioni di campioni raccolti nel periodo che va dal 2007 al 2013, dalle quali sono stati selezionati i campioni idonei sulla base del valore di cellularità calcolata sul prelievo citologico:

- 506 casi derivanti dall'invio a colposcopia di donne con alterazioni al Pap test;
- 218 casi con citologia negativa e/o rilevamento di flogosi.

Tutte le donne hanno eseguito il test HPV entro 6 mesi dal risultato citologico, ed entro 2 mesi, nel caso di alterazione al Pap test, è stata eseguita la visita colposcopica con prelievo di biopsia. I prelievi citologici/istologici per approfondimenti infettivologici vengono inviati alla U.O. Anatomia Patologica, che fa pervenire gli stessi, in caso di richiesta del test HPV, alla U.O. Microbiologia.

Dalla prima popolazione, in base ai risultati della cellularità calcolata sul prelievo citologico (idoneità ≥ 300.000 cell/prelievo), sono stati selezionati 415 casi, che all'esame istologico sono stati classificati nella maniera seguente:

- 116 campioni con nessuna lesione cervicale
- 168 CIN1
- 81 CIN2
- 46 CIN3
- 4 carcinomi.

I corrispettivi 415 tamponi cervicali ThinPrep sono stati suddivisi in base al risultato del Pap test come descritto:

- 76 ASC-US
- 225 L-SIL
- 55 ASC-H
- 59 H-SIL

Dalla seconda popolazione sono stati selezionati 172 campioni citologici con cellularità idonea.

120 campioni citologici idonei (60 HPV positivi e 60 HPV negativi) sono stati analizzati per quanto riguarda la concordanza delle metodiche di rilevazione e genotipizzazione virale in PCR classica; considerando il campione HPV positivo/negativo quando due

metodiche su tre hanno fornito lo stesso risultato. Il confronto è stato possibile in quanto nel periodo di tesi si sono svolte nel nostro laboratorio le gare per la fornitura del kit di rilevazione e genotipizzazione del virus HPV. Su 40 campioni citologici HPV positivi e su 40 campioni citologici HPV negativi, confermati con le metodiche AB ANALITICA e Inno-LiPA, sono state valutate le performance e la concordanza di tre metodiche in Real-Time PCR (Liferiver, BIO-RAD e BIORON).

Tutti i campioni citologici idonei e istologici sono stati analizzati per la positività all'HPV e per la presenza di infezioni multiple. Nei campioni positivi all'HPV16 è stata misurata la carica virale e il grado di integrazione nel genoma ospite.

PRE-TRATTAMENTO DEI CAMPIONI CITOLOGICI

Il campione citologico, dal quale è stato estratto il DNA, è rappresentato dallo stesso tampone cervicale ThinPrep eseguito con spatola di Ayre e cytobrush, utilizzato per il Pap test. Il protocollo di pre-trattamento è stato scelto in base allo studio di *Bianchi e collaboratori (2013)*, in cui si evidenzia come il protocollo di pretrattamento ed estrazione dei campioni riportato in **Fig. 8** (protocollo B), risulti il migliore in termini di inattivazione/purificazione dagli inibitori e di valori di cell/PCR più elevati tra i protocolli valutati. Il protocollo prevede la centrifugazione di 2 ml di liquido ThinPrep a 8.000 rpm per 5 min e la successiva sospensione del pellet in 400 µl di **buffer** di lisi ATL (Animal Tissue Lysis, Qiagen).

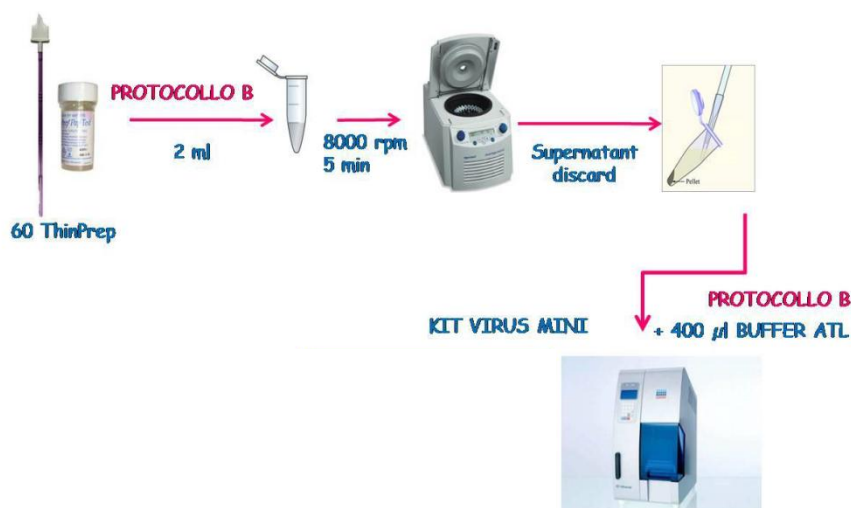


Figura 8. Protocollo di pre-trattamento campioni citologici secondo Bianchi e collaboratori (2013).

PRE-TRATTAMENTO DEI CAMPIONI ISTOLOGICI

Il campione istologico, da cui si estrae il DNA, è rappresentato da tessuto cervicale incluso in paraffina. I campioni di tessuto devono essere sparaffinati prima di procedere all'estrazione del DNA. Mediante microtomo vengono preparate tre fettine da 10 µm per ogni campione, che vengono poste in acqua preriscaldata per ammorbidire la paraffina e permetterne la raccolta su tre vetrini. Tali vetrini vengono messi in stufa a 65°C per 1 h; dopodiché si effettuano lavaggi seriali a concentrazioni decrescenti di alcool per reidratare, senza causarne la lisi, le fettine di tessuto. In particolare per tre cicli si tengono 10 min in **K-Clear** (Kaltex), un analogo non tossico del solvente xilolo; poi 10 in etanolo al 100%; 5 min in etanolo al 90%, 70%, 50% ed infine 2 min in H₂O_{dist}. A questo punto le cellule del tessuto, ormai sparaffinate, vengono raschiate dal vetrino con un ago, adagiate sul fondo di una provetta di estrazione e si aggiungono 200 µl di **buffer** di lisi **G2** (Qiagen) e 10 µl di **proteinasasi K** (Qiagen). La provetta viene quindi inserita nel termo-mixer in agitazione a 56°C per 2 h, durante le quali avverrà la digestione delle cellule. Prima di procedere all'estrazione del DNA si aggiungono 200 µl di **buffer** di lisi **ATL** (Qiagen).

ESTRAZIONE DEL DNA

Per entrambe le tipologie di campioni l'estrazione consiste nell'utilizzo dell'**EZ1 Virus Mini Kit v2.0** (Qiagen); il processo di estrazione viene effettuato con l'estrattore automatico **EZ1 Advanced** (Qiagen). Il kit contiene delle cartucce di reagenti presigillate che contengono tra le varie soluzioni, particelle magnetiche che si legano al DNA del campione lisato e lo purificano dalle altre componenti cellulari. In ogni seduta viene estratto assieme ai campioni un controllo negativo contenente 400 µl di Buffer ATL o H₂O_{dist} al fine di valutare la presenza di DNA contaminante o di inibitori. La procedura ha una durata di 45 min ed il volume di DNA eluito è pari a 90 µl, conservato a -20°C fino all'analisi.

CONTROLLO INTERNO (IC)

Durante la fase estrattiva, prima che i campioni e il controllo negativo vengano messi nell'estrattore automatico, è stata preparata una mix che contiene 46,4 µl di **buffer AVE** (un buffer di eluizione contenente acqua RNasi-free e sodio azide allo 0,04%, Qiagen); 3,6 µl di **RNA carrier** (un buffer che favorisce il legame del DNA alle biglie magnetiche, Qiagen) e 10 µl di **IC** relativo a *C. trachomatis*. Il controllo interno è una sequenza di DNA sintetica, estranea al genoma umano e al patogeno ricercato, che viene aggiunta per valutare eventuali problemi durante l'estrazione di acidi nucleici o l'inibizione della reazione di amplificazione. Questo step è un monitoraggio del processo estrattivo. Viene

allestita una RT-PCR di controllo con il kit ***C. trachomatis* Plus RG PCR v1** (Qiagen); nel caso in cui si notino variazioni nel segnale dell'IC, quantificate in ± 3 Ct (cycle threshold, ciclo di PCR al quale la fluorescenza generata dall'amplificazione del DNA target supera il valore soglia) rispetto al Ct del controllo negativo, o la mancanza di amplificazione dello stesso, si ottiene una chiara indicazione di inibizione della reazione di PCR o di fallimento del processo estrattivo. A tal proposito si procede diluendo il prelievo citologico 1:10 con successiva riestrazione del campione, mentre per i campioni istologici si procede diluendo l'estratto 1:10 e riallestendo la reazione di amplificazione.

CONTROLLO DI CELLULARITA'

Per verificare l'adeguatezza dei campioni citologici e quantificare il numero di cellule dei campioni istologici è stato utilizzato il kit **Cell Control r-gene** (Biomérieux), che consiste in una Real Time PCR attraverso la quale viene amplificata una porzione del gene umano per la fosforibosil transferasi 1 HPRT1 (**Fig. 9**). In ogni seduta di amplificazione, contemporaneamente ai campioni, sono stati amplificati tre standard, a concentrazioni note: gli standard **QS1** e contenente 10.000 copie/ μ l di HPRT1 e **QS2**, contenente 1.000 copie/ μ l, forniti nel kit, e lo standard **QS3**, ottenuto attraverso la diluizione 1:10 dello standard **QS2**, contenente quindi 100 copie/ μ l.

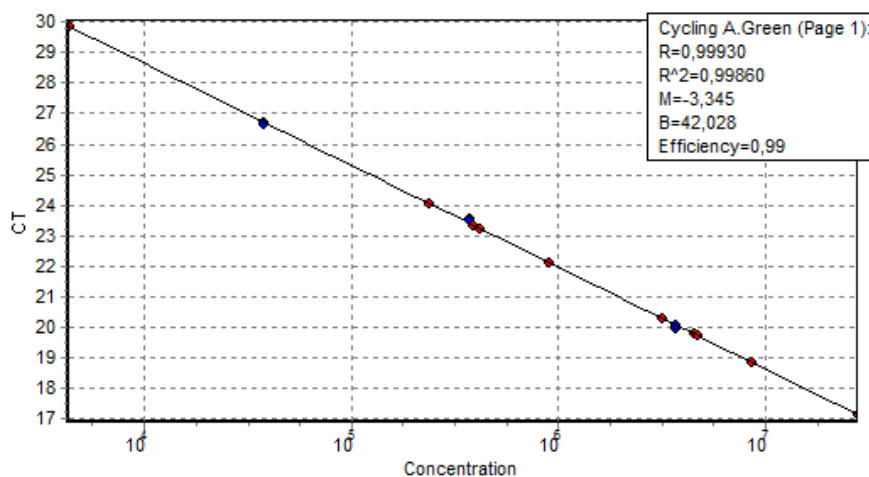


Figura 9. Curva standard per la quantificazione della cellularità.

La quantificazione della cellularità del campione viene effettuata mediante interpolazione dei tre punti standard della curva, con generazione da parte del software di una retta di regressione che mette in correlazione il Ct ottenuto dal campione (sull'ordinata) e la relativa quantità di cellule di partenza (sull'ascissa).

Ogni seduta è stata validata analizzando il coefficiente di correlazione della curva standard generata ($R^2 \geq 0,99$) e l'efficienza di reazione ($0,90 \leq \text{eff} \leq 1,1$).

Il cut-off scelto per l' idoneità del campione citologico ThinPrep è di 300.000 cellule/prelievo. La scelta del cut-off è stata fatta in base ad uno studio su 332 tamponi cervicali ThinPrep estratti con il protocollo B (descritto precedentemente) presentato nello workshop italiano del congresso Eurogin 2013 (*Turrisi et al., 2013*), in cui la positività all'HPV (**Graf. 2**) sopra e sotto tale cut-off differiva in maniera statisticamente significativa (χ^2 , $p < 0,005$).

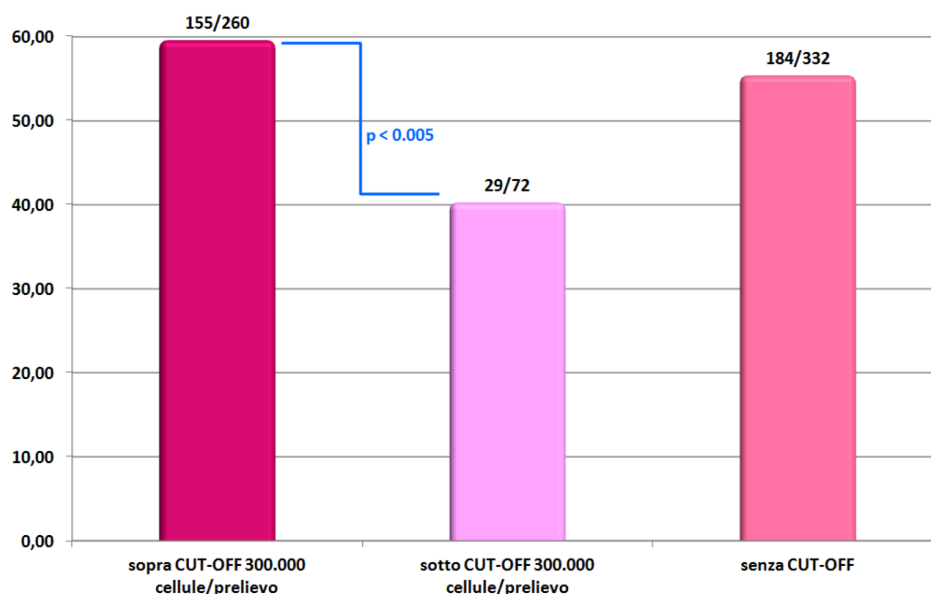


Grafico 2. Frequenza di campioni positivi all'HPV con cellularità sopra e sotto 300.000 cell/prelievo

Nel caso in cui la cellularità del campione citologico risulti elevata, compromettendo la reazione di genotipizzazione per inibizione dovuta a quantità elevate di DNA, il campione viene riestratto e/o diluito 1:10 e sottoposto a nuova amplificazione.

CONTROLLO POSITIVO HPV 16 (NIBSC code: 06/202)

Sia per poter valutare le sensibilità analitiche dei vari metodi di genotipizzazione che per poter quantificare in Real Time PCR, mediante una retta di taratura, la carica virale e il grado di integrazione dei campioni positivi all'HPV 16, abbiamo usato uno standard internazionale per l'HPV 16 a concentrazione nota (9.740 copie/ μ l). Tale controllo è fornito dal National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), il principale laboratorio degli standard della World Health Organization (WHO).

CONTROLLO NATIONAL EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SERVICE (NEQAS)

Il nostro laboratorio partecipa al protocollo di valutazione della qualità inter-laboratorio (valutazione esterna di qualità, VEQ): è un programma fornito da varie aziende per valutare l'uniformità e l'accuratezza dei risultati ottenuti in laboratori differenti che permette di fare una valutazione comparativa dei diversi metodi adottati. I programmi di VEQ intendono verificare su base sistematica che i risultati ottenuti siano conformi alle aspettative della qualità richiesta per la cura del paziente. In particolare permettono di valutare la performance analitica e interpretativa del laboratorio. Nel nostro laboratorio per l'HPV viene utilizzato il programma di VEQ fornito dall'UK NEQAS, un organismo nazionale della Gran Bretagna che opera in maniera indipendente dalle aziende diagnostiche e sotto stretto controllo del Ministero della Sanità britannico. Questo controllo permette di valutare la rilevazione e genotipizzazione dei 13 HR-HPV più frequenti (16-18-31-33-35-39-45-51-52-56-58-59-68) con la possibilità di utilizzare una metodica di conferma ed il criterio interpretativo applicato dal laboratorio.

METODICHE UTILIZZATE PER LA RICERCA E GENOTIPIZZAZIONE DELL'HPV IN PCR CLASSICA

METODICA INNO-LiPA

La metodica di genotipizzazione virale usata nel nostro laboratorio fino alla fine dell'anno 2012 è il test **INNO-LiPA HPV Genotyping Extra** (Innogenetics); il kit prevede una PCR classica utilizzando il set di primers SPF10 biotinilati, che hanno come target una regione di 65 bp all'interno del gene virale L1. Contemporaneamente viene amplificato un frammento di circa 300 bp del gene umano del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (HLA-DBP1), che serve come controllo qualitativo di adeguatezza del campione. Il protocollo di amplificazione prevede che 6 µl di DNA estratto dal campione siano aggiunti alla mix di amplificazione composta da 22,62 µl di **Amplification mix** e 1,38 µl di **Enzyme mix**; il profilo termico è il seguente:

HOLD: 37°C x 10 min

HOLD: 94°C x 9 min

CYCLING: 94°C x 30 sec	} 40 cicli
52°C x 45 sec	
72°C x 45 sec	

I campioni amplificati, terminata la reazione, devono essere conservati fino alla fase di rilevazione a -20°C. Questo perché tale kit è dotato del sistema dUTP/UNG, ovvero nell'amplificato in formazione non viene inserito il nucleotide dTTP ma dUTP; così facendo l'enzima Uracil-N-Glicosilasi (UNG), attivo anche a temperatura ambiente, può eliminare possibili contaminazioni da DNA amplificato nella mix di amplificazione. L'attività enzimatica viene disattivata durante l'amplificazione nel secondo step del profilo termico a 94°C.

La visualizzazione di avvenuta amplificazione (**Fig. 10**) viene effettuata su gel al 3% di **agarosio** (AB ANALITICA) sciolto in **TBE** (Tris-Borato-EDTA) **1X** (IBI Scientific) ed arricchito con l'intercalante del DNA **EtBr** (EuroClone).

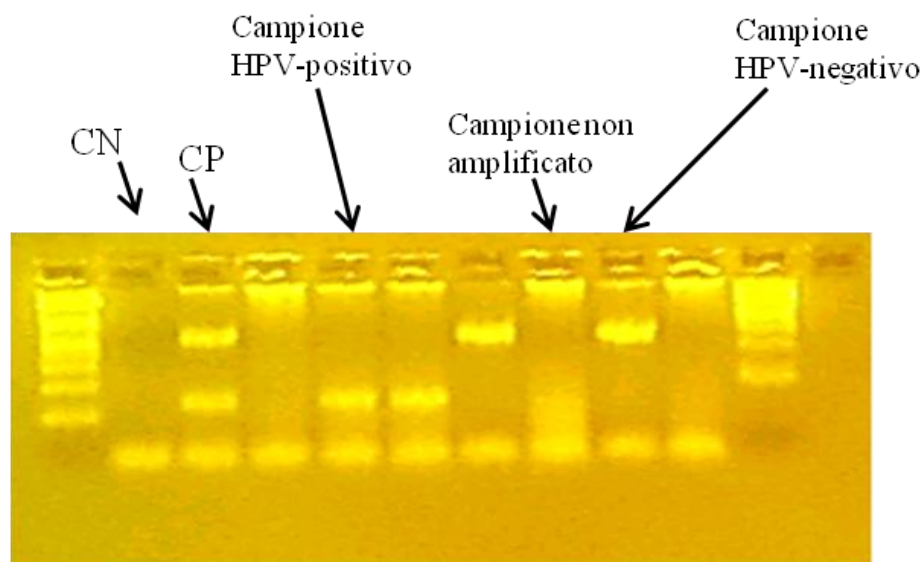


Figura 10. Visualizzazione degli amplificati su gel di agarosio al 3% arricchito con EtBr, CP = controllo positivo, CN = controllo negativo.

I campioni HPV-positivi vengono rilevati e genotipizzati con la strumentazione semi-automatica **Auto-Lipa** (Innogenetics), mediante ibridazione inversa su striscia di nitrocellulosa. Gli amplificati biotinilati si legano alla steptavidina coniugata con la fosfatasi alcalina che reagisce con un substrato cromogeno, formando un precipitato colorato in corrispondenza del legame con le sonde.

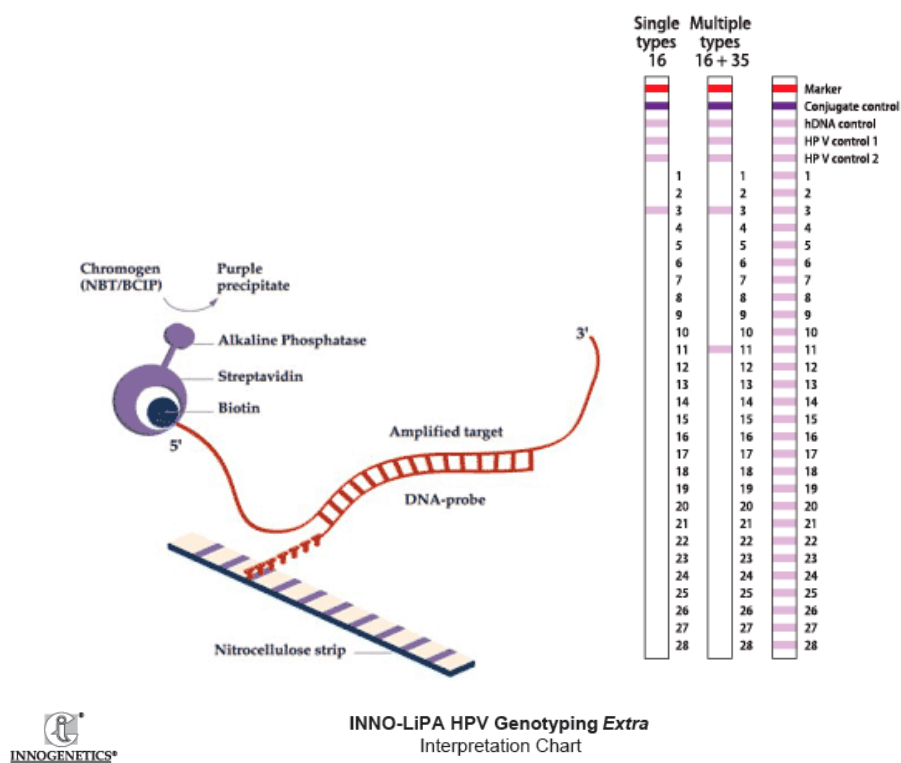
Questo test rileva 28 tipi di HPV descritti in **Tab. 8**.

ALTO RISCHIO	PROBABILE ALTO RISCHIO	RISCHIO NON DEFINITO	BASSO RISCHIO
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82	26, 53 e 66	69, 71 e 74	6, 11, 40, 43, 44, 54 e 70

Tabella 8. Genotipi rilevati dalla metodica INNO-LiPA.

Le strisce vengono lette grazie all'apposita maschera interpretativa che permette di stabilire la combinazione di bande ottenute nel test; il pattern risultato viene poi interpretato con il manuale del kit che permette di associare ad ogni combinazione di bande i vari genotipi (**Fig. 11**).

Il campione analizzato risulta HPV negativo quando sulla striscia compare la banda del controllo del coniugato e del gene umano (che devono sempre essere presenti) ma nessuna banda relativa al DNA di HPV. La metodica evidenzia delle cross-reattività tra i genotipi 68-73-97 e le coinfezioni tra i genotipi 31-54, 33-54, 45-68 e 70-68 non vengono rilevate, ma risulta solamente il primo genotipo della coinfezione. La sensibilità analitica dichiarata per la metodica si attesta sulle 2-7 copie di DNA virale/μl. Il tempo richiesto da questa metodica per l'operatore è limitato all'allestimento della PCR e alla preparazione dei reagenti per la strumentazione semi-automatica. Permette la rilevazione e la genotipizzazione di 48 campioni a seduta in circa 6 ore, compresa la fase di amplificazione.



	HPV genotypes																																	
Probe #	6 LR	11 LR	16 HR	18 HR	26* pHR	31 HR	33 HR	35 HR	39 HR	40 LR	43 LR	44 LR	45 HR	46 HR	51 HR	52 HR	53* pHR	53* pHR	54 LR	56 HR	58 HR	58 HR	58 HR	58 HR	59 HR	66* pHR	68 HR	69/71***	70 LR	73 HR	74***	82 HR		
1	X																																	
2		X																																
3			X																															
4				X																														
5					X																													
6						X																												
7																													X					
8						X				X														X	X									
9						X		X											X															
10						(X)***	X																											
11									X																									
12				X	X																							X				X		
13										X																								
14											X																							
15												X																						
16													X	X																				
17															X																			
18						X	X				X						X	X			X	X	X	X										
19																	X	X																
20																				X														
21																				X													X	
22																					X	X	X	X										
23																										X								
24															X												X							
25																											X			X	X			
26																													X	X				
27																															X			
28																																		X

*: 26, 53 and 66 are considered probable high-risk (pHR) genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518-27.
 ***: 69, 71 and 74 are not classified as high-risk, probable high-risk or low risk genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518-27.
 ***: probeline 10 may show weak reactivity when probelines 9 and 9 are positive; in this case the sample should be interpreted as genotype 31

© 2007 Innogenetics

27279 v1
2007-11-30
p1/1

Figura 11. Principio alla base della rilevazione dei genotipi su striscia, esempio di strisce positive e manuale di interpretazione delle bande.

METODICA AB ANALITICA

L'altra metodica di rivelazione e genotipizzazione utilizzata per la diagnostica di routine è il kit **AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS v2.0** (AB ANALITICA). Il test prevede una PCR classica usando un set di primer biotinilati, che hanno come target 139-145 bp (a seconda del genotipo) della regione L1 virale. Contemporaneamente una coppia di primer

amplifica 202 bp del gene umano per l'enzima tio-sulfo-transferasi (TST), che serve da controllo di cellularità qualitativo per la presenza di DNA umano. Vengono usati 20 µl di **HPV-TYPE EXPRESS MIX** + 5 µl di DNA per campione; il controllo positivo e negativo servono per verificare che l'amplificazione di DNA virale avvenga con successo e che la mix di amplificazione non sia contaminata.

Il profilo termico di amplificazione è il seguente:

HOLD: 50°C x 2 min

HOLD: 95°C x 10 min

CYCLING: 95°C x 30 sec
50°C x 30 sec
72°C x 30 sec

} 50 cicli

HOLD: 75°C x 5 min

Questo kit, come il kit InnoLiPA, è dotato del sistema dUTP/UNG e quindi i campioni amplificati, terminata la reazione, devono essere conservati fino alla fase di rilevazione a -20°C. L'attività enzimatica viene disattivata durante l'amplificazione nel secondo step del profilo termico a 95°C.

La visualizzazione della corretta amplificazione del DNA virale e umano (**Fig. 12**) è possibile su gel al 3% di **agarosio** (AB ANALITICA) disciolto in **TBE** (Tris-Borato-EDTA) **1X** (IBI Scientific) ed aggiunta dell'intercalante bromuro di etidio (**EtBr**, EuroClone).

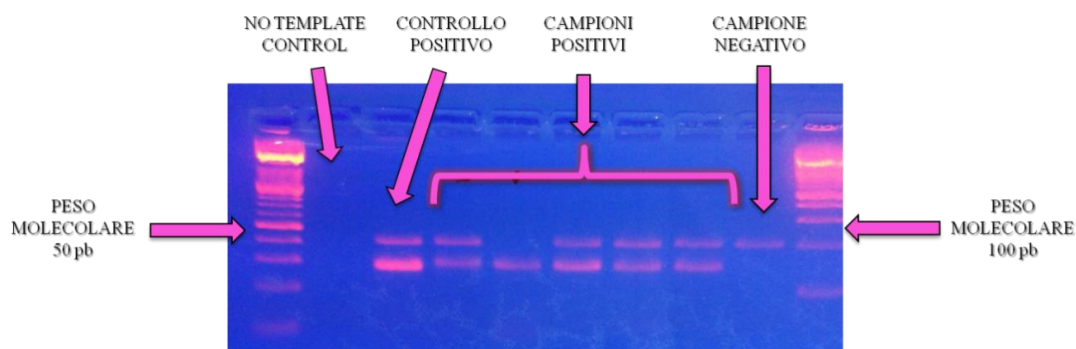


Figura 12. Visualizzazione degli amplificati su gel di agarosio al 3%

La fase di rivelazione e genotipizzazione virale avviene in maniera semi-automatizzata con lo strumento **Autoblot 3000** (AB ANALITICA); gli amplificati vengono fatti ibridare con specifiche sonde adese ad una striscia di nylon, sfruttando la metodica dell'ibridazione inversa. Il loro legame viene visualizzato mediante l'aggiunta di una fosfatasi alcalina

coniugata con streptavidina, che si lega alla biotina contenuta negli amplificati, e successivamente di un substrato cromogeno.

L'interpretazione dei risultati positivi viene effettuata attraverso il confronto della combinazione di bande ottenute nel test e l'apposita maschera di lettura (**Fig. 13**).

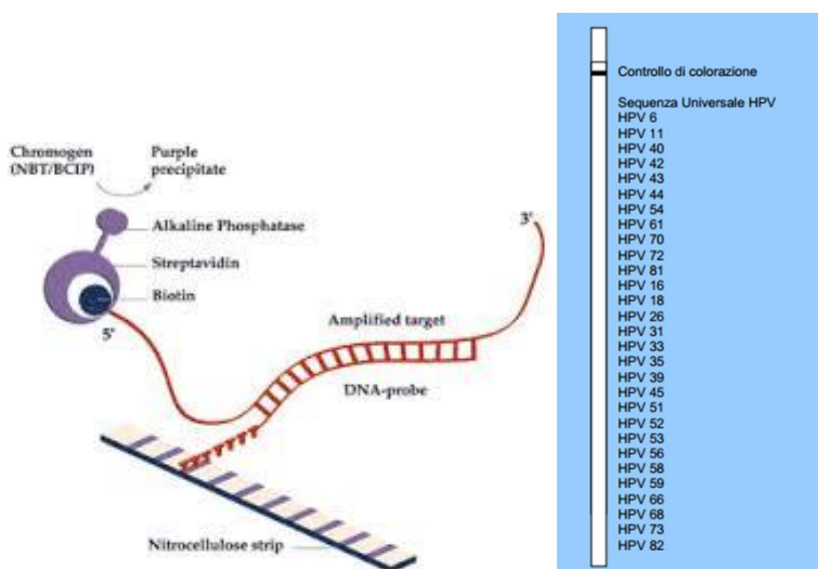


Figura 13. Principio alla base della rilevazione dei genotipi su striscia e maschera di lettura.

In questo modo vengono rilevati i genotipi descritti nella **Tabella 9**.

ALTO RISCHIO	PROBABILE ALTO RISCHIO	BASSO RISCHIO
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82	26, 53 e 66	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81

Tabella 9. Genotipi rilevati dalla metodica AB ANALITICA.

Il campione analizzato, invece, risulta HPV negativo quando sulla striscia compare la banda del controllo di ibridazione e del gene umano (che devono sempre essere presenti) ma nessuna banda relativa al DNA di HPV. Se le due bande di controllo non sono presenti significa che il processo di ibridazione non è avvenuto correttamente (se manca la banda del coniugato) o che il campione era inadeguato (se manca la banda del gene umano) per: scarsità di cellule, concentrazione troppo elevata del DNA; presenza di inibitori; errata

estrazione. La sensibilità dichiarata dal manuale per l'HPV16 è di 10 copie di DNA virale/μl. Permette di rilevare e genotipizzare fino a 20 campioni a seduta in 4/5 ore, compresa la fase di amplificazione, con un tempo operatore di 1 ora.

METODICA BCS

Altro saggio di rivelazione e genotipizzazione dei ceppi HPV è il **ProDect CHIP HPV TYPING** (BCS Biotech). Questo kit amplifica e rivela simultaneamente le regioni virali L1 con i primers biotinilati GP5+/GP6+ (143 bp) e le regioni E6/E7 con i primers biotinilati pU-1M/pU-2R (233-268 bp) dell' HPV; inoltre è presente un controllo di cellularità qualitativo che ha come target la β-globina umana (178 bp). La caratteristica di avere un doppio target attribuisce teoricamente un vantaggio alla metodica in termini di sensibilità, poiché rilevando le regioni E6/E7 la presenza del virus può essere diagnosticata anche nei casi in cui il DNA del patogeno si integra e perde le regioni che ne permettono la genotipizzazione. Rileva e genotipizza 19 tipi di HPV, mentre evidenzia la regione E6/E7 di 10 genotipi (**Tab. 10**).

ALTO RISCHIO	BASSO RISCHIO	Regione E6/E7
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 e 73	6, 11, 42, 43 e 44	16-18-31-33-35-45-51-52-56 e 58

Tabella 10. Genotipi rilevati dalla metodica mediante amplificazione della regione L1 e della regione E6/E7 virale.

5 μl di DNA estratto dal campione vengono amplificati con 44,5 μl di mix e 0,5 μl di DNA polimerasi, secondo il profilo termico seguente:

HOLD: 94°C x 2 min

CYCLING:	94°C x 30 sec	} 5 cicli
	50°C x 1 min	
	72°C x 1 min	

CYCLING:	94°C x 30 sec	} 40 cicli
	45°C x 1 min	
	72°C x 30 sec	

HOLD: 75°C x 5 min

La fase di rilevazione, non automatizzata, prevede che gli amplificati vengano fatti ibridare su chip con apposita soluzione e incubati per un'ora nel termo mixer **ProDect® BCS Mini Oven** (BCS Biotech). Successivamente segue la fase di lavaggio (3 cicli da un minuto con apposita soluzione di lavaggio da preparare) e l'aggiunta di una soluzione contenente streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina, incubata per 30 min. Dopo un'ulteriore fase di lavaggio, come descritto precedentemente, viene aggiunto il substrato cromogeno, a cui segue una fase di incubazione al buio per 15 min. La presenza della sequenza bersaglio è evidenziata dalla formazione di un precipitato di colore scuro in corrispondenza della relativa sonda. Il campione per poter essere considerato HPV-negativo deve avere lo spot del controllo di ibridazione e quello della β -globina. Nella **Figura 14** possiamo vedere il pattern interpretativo degli spot.

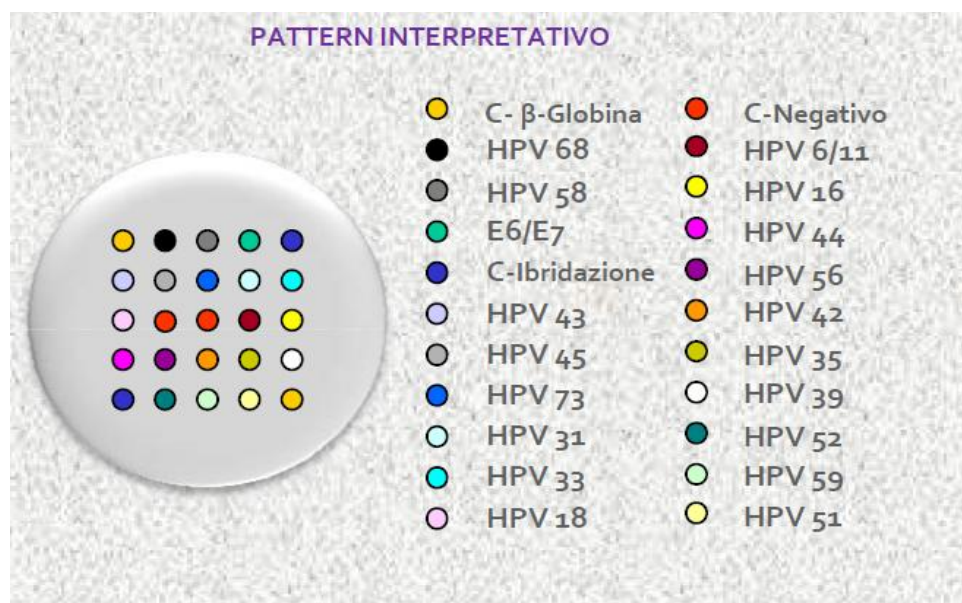


Figura 14. Pattern di interpretazione degli spot per la lettura dei risultati.

La lettura può essere fatta manualmente o servendosi dell'apposito scanner di micropiastre **ProDect® BCS Biochip Reader** (BCS Biotech) con acquisizione di immagine. Il software analizza le immagini e produce i referti relativi all'analisi. La metodica evidenzia cross-reattività tra i genotipi 6 e 11. La sensibilità analitica della metodica è dichiarata essere pari a 1 copia/ μ l per la regione virale L1, mentre varia a seconda del genotipo per la regione E6/E7 con valori che vanno dalle 69 alle 690 copie/ μ l. La metodica permette teoricamente di rilevare e genotipizzare fino a 96 campioni a seduta. La durata del saggio è influenzata dal numero di campioni, non essendo automatizzata la fase di rilevazione; per una seduta

media di 15 campioni la durata è di circa 6/7 ore, compresa la fase di amplificazione con tempo operatore di 2-3 ore.

METODICHE DI RILEVAZIONE E GENOTIPIZZAZIONE DELL'HPV IN REAL-TIME PCR

METODICA RealLine

Il kit **RealLine HPV High Risk Gentotype Fla-Format** (BIORON) è un saggio qualitativo in RT-PCR che rileva, con primer diretti verso la regione virale L1, 12 HPV ad alto rischio (**Tab. 11**) e ne permette la genotipizzazione.

ALTO RISCHIO
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59

Tabella 11. Genotipi rilevati con metodica RealLine.

Il principio di tale metodica si basa sulla rilevazione della fluorescenza emessa da sonde TAQMAN, proporzionale alla quantità di amplificato prodotto. Con questo kit è possibile rilevare i campioni a infezione multipla. Il kit contiene 4 diverse mix rilevanti ciascuna 3 genotipi sul canale di fluorescenza Green, Yellow e Orange (**Tab. 12**).

Test-tube	Genotipi HPV			
	Green channel	Yellow channel	Orange channel	Red channel
MM1	16	18	39	IC
MM2	33	45	56	IC
MM3	31	35	58	IC
MM4	52	51	59	β-actina

Tabella 12. Genotipi, IC e CC rilevati da ciascuna mix.

Il kit presenta un controllo interno, da aggiungere al campione prima dell'estrazione, per poter valutare il processo estrattivo e successivamente quello di amplificazione; inoltre per

valutare la qualità del campione e l'adeguata presenza di DNA cellulare sul canale Red nella master mix numero 4 viene rilevata la β -actina umana. 25 μ l di DNA estratto vengono aggiunti a 25 μ l di ciascuna mix (le mix liofilizzate sono sospese in 250 μ l di *Recovery Solution* presente nel kit).

Il profilo termico di amplificazione è il seguente:

HOLD: 50°C x 2 min

HOLD: 95°C x 2 min

CYCLING:	94°C x 10 sec	} 50 cicli
	60°C x 25 sec (Acquisizione sui canali Green,	
	Yellow, Orange, Red)	

La positività per l'HPV viene rilevata se il campione presenta un $Ct \leq 35$; la presenza adeguata di DNA umano viene validata se il campione presenta un $Ct \leq 32$. La sensibilità clinica e analitica dichiarate dal kit sono del 100%. La metodica richiede che ogni campione sia amplificato nelle 4 diverse mix.

METODICA LIFERIVER

Il kit **Uterine Cervix Cancer of High-risk HPV Genotype Related Real-time PCR** (Liferiver) rileva e genotipizza i 13 genotipi ad alto rischio più frequenti, con primer diretti verso la regione L1 virale (**Tab. 13**):

ALTO RISCHIO
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68

Tabella 13. Genotipi rilevati dal kit

Il principio della rivelazione in Real Time PCR si basa in questo caso su sonde TAQMAN. Il kit contiene 8 diverse mix (**Tab. 14**) che rilevano genotipi singoli o a coppie sui canali di fluorescenza FAM e JOE; inoltre è presente un controllo di cellularità diretto verso il gene Human MiniBrain Homologue (MNBH). La sensibilità analitica dichiarata dal kit è di 5 copie/ μ l.

Test-tube	Genotipi HPV	
	Green channel	Yellow channel
MM1	16	56
MM2	18	45
MM3	35	59
MM4	39	51
MM5	58	52
MM6	31	CC
MM7	33	-
MM8	68	-

Tabella 14. Genotipi e CC rilevati da ciascuna mix.

Il saggio richiede che 4 µl di DNA di ogni campione siano amplificati in 36 µl delle 8 diverse mix. Con questa metodica è possibile rilevare i campioni a infezione multipla. Per quanto riguarda l'analisi dei risultati il campione viene considerato positivo se presenta un $Ct \leq 38$. L'adeguatezza del campione viene valutata mediante positività/negatività nella mix 6 sul canale Yellow.

Il profilo termico di amplificazione è il seguente:

HOLD: 94°C x 2 min

CYCLING: 93°C x 10 sec

62°C x 31 sec (Acquisizione sui canali Green e Yellow) } 40 cicli

METODICA BIO-RAD

Il kit **Dx HR-HPV Auto Assay** (BIO-RAD) permette la rilevazione, ma non la genotipizzazione, dei 13 HR-HPV più frequenti mediante primer diretti verso le regioni E1/E6 virali (**Tab. 15**).

ALTO RISCHIO
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68

Tabella 15. Genotipi rilevati dalla metodica.

Contemporaneamente al DNA virale viene amplificata una porzione del gene della β -globina per valutare la presenza di cellule nel campione. E' presente anche un controllo interno da aggiungere in sede di estrazione per monitorare il processo estrattivo e di amplificazione. La metodica prevede che l'amplificazione avvenga su piastra in sedute da 24 pozzetti, fino ad un massimo di 96 campioni (compreso il controllo negativo e il controllo positivo presenti nel kit). 10 μ l di DNA estratto del campione vengono amplificati con 10 μ l di master mix ricostituita in uno specifico buffer di diluizione. L'amplificazione avviene su strumentazione automatica **Dx Real-Time System** (BIO-RAD) e Software **Dx Real-Time** (BIO-RAD). Il software analizza i dati e fornisce i risultati considerando il campione positivo all'HPV se presenta un $Ct \leq 38$ e valida l'idoneità del prelievo se il Ct della β -globina è ≤ 30 .

METODICA IN REALTIME PCR DI QUANTIFICAZIONE DELL'HPV 16

La quantificazione della carica e il grado di integrazione nei campioni citologici ed istologici sono stati valutati con il metodo di Peitsaro e collaboratori (2002). La metodica è una metodica RealTime PCR con rivelazione degli amplificati tramite analisi con le curve di MELT. Sono stati utilizzati i primer che amplificano le regioni target virali E2 ed E6 riportate in **Tabella 16**.

NOME	SEQUENZA	LUNGHEZZA FRAMMENTO	TARGET	T° DI ANNEALING
16E2F	5'-AACGAAGTATCCTCTCCTGAAATTATTAG-3'	82 bp	E2	59°C
16E2R	5'-CCAAGGCGACGGCTTTG-3'			60°C
16E6F	5'-GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC-3'	81 bp	E6	59°C
16E6R	5'-TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC-3'			60°C

Tabella 16. Sequenze dei primer per l'amplificazione della regione E2 ed E6 virale (Peitsaro et al., 2002).

Le sequenze target sono evidenziate all'interno di entrambe le regioni qui sotto riportate.

Regione E2 (NCBI Reference Sequence: NC_001526.2) 2775-3852 bp

ATGGGAGACTCTTTGCCAACGTTTAAATGTGTGTCAGGACAAAATACTAACACATTATGAAA
ATGATAGTACAGACCTACGTGACCATATAGACTATTGGAAACACATGCGCCTAGAATGTGC
TATTTATTACAAGGCCAGAGAAATGGGATTTAAACATATTAACCACCAAGTGGTGCCAACA
CTGGCTGTATCAAAGAATAAAGCATTACAAGCAATTGAACTGCAACTAACGTTAGAAACAA
TATATAACTCACAATATAGTAATGAAAAGTGGACATTACAAGACGTTAGCCTTGAAGTGTA
TTTAACTGCACCAACAGGATGTATAAAAAAACATGGATATACAGTGGAAGTGCAGTTTGAT

GGAGACATATGCAATACAATGCATTATACAAACTGGACACATATATATATTTGTGAAGAAG
CATCAGTAACTGTGGTAGAGGGTCAAGTTGACTATTATGGTTTATATTATGTTTCATGAAGG
AATACGAACATATTTTGTGCAGTTTAAAGATGATGCAGAAAAATATAGTAAAAATAAAGTA
TGGGAAGTTCATGCGGGTGGTCAGGTAATATTATGTCCTACATCTGTGTTTAGCAGCAACG
AAGTATCCTCTCCTGAAATTATTAGGCAGCACTTGGCCAACCACCCCGCCGCGACCCATAC
CAAAGCCGTCGCCTTGGGCACCGAAGAAACACAGACGACTATCCAGCGACCAAGATCAGAG
CCAGACACCGGAAACCCCTGCCACACCACTAAGTTGTTGCACAGAGACTCAGTGGACAGTG
CTCCAATCCTCACTGCATTTAACAGCTCACACAAAGGACGGATTAACTGTAATAGTAACAC
TACACCCATAGTACATTTAAAAGGTGATGCTAATACTTTAAAATGTTTAAGATATAGATTT
AAAAAGCATTGTACATTGTATACTGCAGTGTCGTCTACATGGCATTGGACAGGACATAATG
TAAACATAAAAGTGCAATTGTTACACTTACATATGATAGTGAATGGCAACGTGACCAATT
TTTGTCTCAAGTTAAAATACCAAAAACCTATTACAGTGTCTACTGGATTTATGTCTATATGA

Regione E6 (NCBI Reference Sequence: NC_001526.2) 83-559 bp

ATGCACCAAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCAC
AGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACCTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAA
GCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATAT
AGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATTAGTG
AGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAACAAACC
GTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAAGCCACTGTGTCCTGAAGAAAAG
CAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACCGGTTCGAT
GTATGTCTTGTGTCAGATCATCAAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA

La mix di reazione (Tab. 17) per ognuna delle due regioni “ target” è stata preparata seguendo le indicazioni di *Peitsaro e collaboratori* (2002) e come intercalante del DNA è stata usata la **KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal** (Kapabiosystem).

COMPONENTI	CONCENTRAZIONE FINALE	10 µl REAZIONE
H ₂ O	-	3,6 µl
PRIMER F (10 µM)	200 nM	0,2 µl
PRIMER R (10 µM)	200 nM	0,2 µl
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Universal	1X	5 µl
DNA	(< 20 ng/20 µl)	1 µl

Tabella 17. Mix di reazione per l'amplificazione dei geni virali E2 ed E6.

Ogni campione HPV16 positivo è stato testato in triplicato; il profilo termico della reazione è il seguente:

HOLD: 95°C x 3 min

CYCLING: 95°C x 3sec

60°C x 60 sec (Signal acquisition
on Green channel)

} 40 cicli

MELT: 70-94°C

La quantificazione delle regioni target dei geni virali E2 ed E6 è stata effettuata mediante curve standard di calibrazione costruite per diluizione scalare (1:10, 1:100, 1:1.000) dello standard di riferimento della WHO per l'HPV16 a concentrazione nota (9.470 copie/μl). Ogni reazione di amplificazione è stata validata analizzando il coefficiente di correlazione delle due curve standard generate ($R^2 \geq 0,99$) e l'efficienza di reazione delle due coppie di primers ($0,90 \leq \text{eff} \leq 1,1$). La carica virale è stata normalizzata per la cellularità del campione testato ed espressa come copie di E6/cellula. La specificità dei prodotti di amplificazione è stata verificata mediante l'analisi della "curva di melting" per entrambe le regioni target dei geni virali studiati.

La ripetibilità intra-saggio è stata valutata confrontando la carica calcolata per ciascun punto della curva prodotto in triplicato nella stessa seduta. La ripetibilità inter-saggio, è stata calcolata confrontando la media della carica calcolata per ciascun punto della curva in 17 sedute diverse. Come limite di sensibilità è stata presa la diluizione a scalare più bassa dello standard WHO per l'HPV16 che il metodo è capace di discriminare in maniera corretta con un CV < 10%.

ANALISI STATISTICA DEI DATI

Per l'analisi dei dati sono stati utilizzati i seguenti indici e test statistici:

1. media, mediana, 25-esimo e 75-esimo percentile, valore minimo e massimo, varianza, errore standard e intervallo di confidenza al 95% per l'analisi della cellularità, della carica virale e del grado di integrazione;
2. indice di concordanza, o "kappa di Cohen", per valutare la concordanza dei risultati forniti dai vari HPV DNA test utilizzati;
3. il Mc Nemar's test, per stabilire quanto la concordanza fra i vari metodi di genotipizzazione eccede la concordanza attesa per semplice effetto del caso (valore di significatività: $p < 0,05$);

4. il test del chi-quadro (χ^2) per la verifica di differenze statisticamente significative nelle frequenze di positività, genotipi e infezioni multiple osservate nei vari gruppi di lesioni cito/istologiche (valore di significatività: $p < 0,05$);
5. il t di Student, per la verifica di differenze statisticamente significative nelle medie di carica virale e grado di integrazione fra i vari gruppi di lesioni cito/istologiche (valore di significatività: $p < 0,05$);
6. l'Odds Ratio (OR), usato come indice per definire il rapporto di causa-effetto tra la presenza di determinati genotipi o combinazioni di essi e lo sviluppo di lesioni, con il relativo calcolo di varianza, errore standard ed intervallo di confidenza al 95% calcolato mediante il metodo di Woolf. L'OR è stato ritenuto significativo quando l'intervallo di confidenza era o compreso tra 0 e 1 (diminuito rischio di sviluppare una determinata lesione) o > 1 (aumentato rischio di sviluppare una determinata lesione);
7. la funzione di regressione e in particolare l' R^2 , per stabilire l'esistenza o meno di un legame di dipendenza di una variabile con un'altra (in particolare fra carica virale e grado di integrazione).

RISULTATI

VALUTAZIONE DELL'ADEGUATEZZA DEL PRELIEVO

Nel nostro studio la prima indagine effettuata è stata quella di valutare l'idoneità del prelievo. Per questo sono stati analizzati 506 campioni citologici con alterazioni di cui, sulla base del cut-off di 300.000 cellule/prelievo, 415 sono risultati idonei, con una percentuale di inadeguati pari al 18%. Dei 218 campioni citologici senza alterazioni ne sono risultati idonei 172, con una percentuale di inadeguati del 21% (**Graf. 3**).

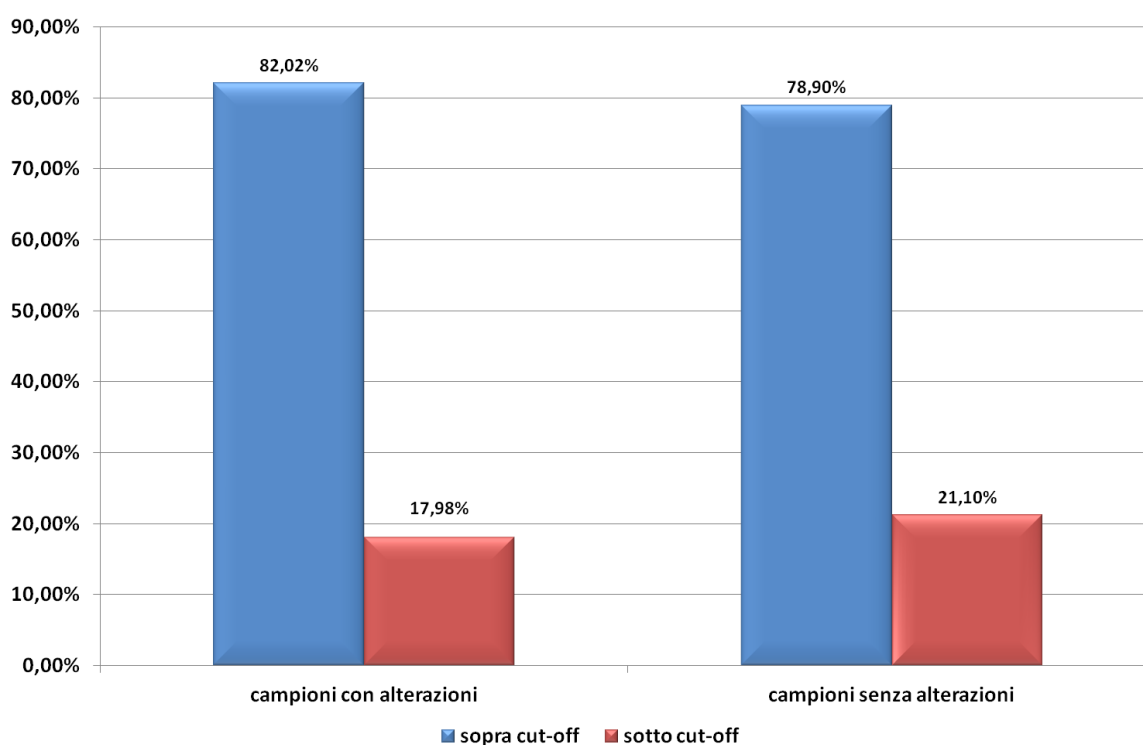


Grafico 3. Percentuali di campioni inadeguati per scarsità cellulare riscontrati nei campioni con o senza alterazioni.

Il valore medio di cellularità ottenuto nei campioni citologici idonei è pari a $3.517.097 \pm 354.518$ cellule/prelievo (195.394 ± 19.695 cell/PCR). La cellularità media dei campioni istologici invece è risultata pari a 10.852 ± 836 cellule/vetrino (365 ± 48 cell/PCR).

ANALISI DELLA CONCORDANZA DEI RISULTATI TRA I VARI METODI DI GENOTIPIZZAZIONE

Metodiche in PCR end-point con successiva rilevazione su striscia o su macroarray

Come mostrato in **Tabella 18**, le metodiche con sensibilità analitica superiore (relativa alla rilevazione dell'HPV16) sono risultate quelle basate sull'ibridazione inversa su striscia (**INNO-LiPA HPV Genotyping Extra**, Innogenetics e **AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS v2.0**, AB ANALITICA) con 9,47 copie/μl come concentrazione minima rilevata. Il kit basato su macroarray **ProDect CHIP HPV TYPING** (BCS Biotech) ha mostrato una sensibilità 10 volte inferiore per la regione L1 (94,7 copie/μl) e 100 volte inferiore per la regione E6/E7 (947 copie/μl), quest'ultima rilevata solo nel 15% dei casi positivi. Le due tecniche basate su ibridazione inversa su striscia sono risultate superiori anche sotto il punto di vista organizzativo, con un tempo operatore inferiore (1 ora vs 2-3 ore) ed una manualità ridotta grazie alla completa automazione della fase di rilevazione. Per quanto riguarda la processività, teoricamente la tecnica con il più alto numero di campioni analizzabili per seduta sarebbe la tecnica BCS (96), anche se nella pratica è risultato pressoché impossibile l'analisi contemporanea di 96 campioni per l'elevata manualità della fase di rivelazione (non automatizzata). Come tempo totale di analisi (Turn Around Time, TAT) la metodica migliore è risultata l'AB ANALITICA, attraverso la quale è possibile analizzare fino a 20 campioni a seduta nell'arco di una giornata (4-5 ore). D'altro canto la metodica INNOLIPA, con circa 2 ore in più, permette l'analisi di più del doppio dei campioni (48).

Metodica	TAT	Tempo operatore	Manualità	Processività	Sensibilità analitica HPV16 dichiarata	Sensibilità analitica HPV16 misurata
AB ANALITICA	4-5 ore	1 ora	Limitata all'allestimento della PCR e preparazione delle strisce	max 20 campioni a seduta	10 copie/μl	9,47 copie/μl
INNOLIPA	6-7 ore	1 ora	Limitata all'allestimento della PCR e preparazione delle strisce	max 48 campioni a seduta	2-7 copie/μl	9,47 copie/μl
BCS	6-7 ore	2-3 ore	Elevata: fase di rivelazione non automatizzata	teoricamente fino a 96 campioni a seduta	1 copia/μl per L1 e 69 copie/μl per E6/E7	94,7 copie/μl per L1 e 947 copie/μl per E6/E7

Tabella 18. TAT, tempo operatore, processività e sensibilità analitiche delle metodiche di rilevazione e genotipizzazione in PCR end-point.

Da un punto di vista tecnico, l'unica differenza di rilievo (oltre ovviamente la tecnologia alla base della rivelazione del segnale) risulta nella presenza di un doppio target virale presente nella metodica BCS (L1 ed E6/E7), che in teoria dovrebbe rendere il test più sensibile (**Tab. 19**) ed in grado di rilevare il virus anche quando è solo presente nella forma integrata con rottura della regione L1, amplificata da altri metodi. Tuttavia, la sensibilità globale più elevata è stata riscontrata per la metodica AB ANALITICA (99%), mentre per BCS e Inno-LiPA è risultata del 94% e 92% rispettivamente. La metodica Inno-LiPA, insieme ad AB ANALITICA, ha mostrato invece la specificità più alta (100%), mentre per BCS è risultata del 96%.

Metodica	Tecnica amplificazione	Tecnica di rivelazione	Target	CC	IC	Genotipi rilevati	Genotipizzazione	Sensibilità	Specificità
AB ANALITICA	PCR end-point	Ibridazione inversa su striscia	L1	si	no	16 HR-HPV + 2 IR-HPV + 11 LR-HPV	si	99%	100%
INNOLIPA	PCR end-point	Ibridazione inversa su striscia	L1	si	no	16 HR-HPV + 5 IR-HPV + 7 LR-HPV	si	94%	100%
BCS	PCR end-point	Macroarray	L1 ed E6/E7	si	no	14 HR-HPV + 5 LR-HPV	si	92%	96%

Tabella 19. Caratteristiche tecniche delle metodiche di rilevazione e genotipizzazione in PCR end-point. Per il calcolo di sensibilità e specificità i campioni sono stati considerati veri positivi o veri negativi quando c'era una concordanza di 2 metodiche su 3.

I risultati hanno evidenziato inoltre un'ottima concordanza tra le tre metodiche analizzate (**Tab. 20**) con un Kappa di Cohen di 0,97/0,96. Dall'analisi statistica effettuata con il Mc Nemar's test emerge che non ci sono differenze statisticamente significative tra i genotipi rilevati con le tre metodiche ($p > 0,05$).

	N° CAMPIONI	KAPPA DI COHEN	p-VALUE
TEST INNOLIPA vs TEST AB ANALITICA	120	0,97	$p > 0,05$
TEST INNOLIPA vs TEST BCS	120	0,96	$p > 0,05$
TEST AB ANALITICA vs TEST BCS	120	0,96	$p > 0,05$

Tabella 20. Concordanza sui genotipi rilevati tra le metodiche di genotipizzazione in PCR end-point.

Metodiche in Real-Time PCR

Come mostrato in **Tabella 21** le tre metodiche in Real Time PCR analizzate hanno tutte mostrato una sensibilità analitica per la rilevazione di HPV16 comparabile a quella riscontrata per le metodiche end-point AB ANALITICA e Inno-LiPA (9,47 copie/μl). Da un punto di vista organizzativo, la metodica BIO-RAD è quella che ha mostrato la migliore processività (96 campioni a seduta) con una manualità ed un tempo operatore ridotti (15 minuti) ed un buon TAT (4 ore). Da un punto di vista tecnico è l'unica tra le tre metodiche in RT-PCR analizzate dotata di doppio target, e quella che ha mostrato maggiore sensibilità (97%) e specificità (95%). Questa metodica tuttavia non permette la genotipizzazione del virus rilevato (**Tab. 22**).

Metodica	TAT	Tempo operatore	Manualità	Processività	Sensibilità analitica HPV16 dichiarata	Sensibilità analitica HPV16 misurata
BIO-RAD	4 ore	15 min	Bassa: limitata all'allestimento della PCR	Elevata: fino a 96 campioni a seduta	-	9,47 copie/μl
BIORON	2 ore	20 min	Bassa: limitata all'allestimento della PCR	Max 18 campioni a seduta	-	9,47 copie/μl
LIFERIVER	2 ore	45 min	Limitata all'allestimento della PCR ma complicata dall'elevato numero di mix (8)	Bassa: max 9 campioni a seduta	5 copie/μl	9,47 copie/μl

Tabella 21. TAT, tempo operatore, processività e sensibilità analitiche delle metodiche di rilevazione e genotipizzazione in Real Time PCR.

Assieme alla BIO-RAD, l'altra metodica provvista di controllo interno è il test BIORON, che è anche in grado di genotipizzare i 12 HR-HPV rilevabili. Anche questo test è caratterizzato da una facilità di esecuzione e da un TAT ancora più ridotto (2 ore), associato ad una elevata sensibilità (97%) e una buona specificità (91%); unica criticità rilevata consiste nella bassa processività (18 campioni a seduta) che lo rendono poco adatto all'analisi di grandi numeri di campioni. La metodica LIFERIVER è risultata quella con maggiori criticità, rappresentate soprattutto dalla difficoltà nell'allestimento della PCR (8 mix per ogni campione) con conseguente ridotto processività (solo 9 campioni a seduta), dalla mancanza di un controllo interno e da una ridotta specificità (85%).

Metodica	Tecnica amplificazione	Tecnica di rivelazione	Target	CC	IC	Genotipi rilevati	Genotipizzazione	Sensibilità	Specificità
BIO-RAD	Real Time PCR	Sonde fluorescenti	E1/E6	si	si	13 HR-HPV	no	97%	95%
BIORON	Real Time PCR	Sonde Taqman	L1	si	si	12 HR-HPV	si	97%	91%
LIFERIVER	Real Time PCR	Sonde Taqman	L1	si	no	13 HR-HPV	si	95%	85%

Tabella 22. Caratteristiche tecniche delle metodiche di rilevazione e genotipizzazione in Real Time PCR. Per il calcolo di sensibilità e specificità i campioni sono stati considerati veri positivi o veri negativi quando c'era una concordanza di 2 metodiche su 3.

Le tre metodiche hanno mostrato una buona concordanza sui risultati forniti, con indici di concordanza globale che variano da 0,84 a 0,88 (**Tab. 23**). Dall'analisi statistica effettuata con il Mc Nemar's test emerge che non ci sono differenze statisticamente significative nei risultati ottenuti attraverso le tre metodiche ($p > 0,05$).

	N° CAMPIONI	KAPPA DI COHEN	p-VALUE
TEST BIO-RAD vs TEST BIORON	80	0,84	$p > 0,05$
TEST BIO-RAD vs TEST LIFERIVER	80	0,85	$p > 0,05$
TEST BIORON vs TEST LIFERIVER	80	0,88	$p > 0,05$

Tabella 23. Concordanza sulla rilevazione e genotipizzazione tra le metodiche in Real Time PCR.

Ottima è risultata anche la concordanza sui risultati forniti rispetto a quanto rilevato con la metodica AB ANALITICA, per tutte e tre le metodiche (**Tab. 24**), con indici di concordanza elevati (da 0,92 a 0,95).

	N° CAMPIONI	KAPPA DI COHEN	p-VALUE
TEST BIO-RAD vs TEST AB ANALITICA	80	0,92	$p > 0,05$
TEST LIFERIVER vs TEST AB ANALITICA	80	0,94	$p > 0,05$
TEST BIORON vs TEST AB ANALITICA	80	0,95	$p > 0,05$

Tabella 24. Concordanza sulla rilevazione e genotipizzazione tra le metodiche in Real Time PCR e la metodica AB ANALITICA.

CORRELAZIONE TRA ALTERAZIONE CITOLOGICA E LESIONE ISTOLOGICA

I 415 campioni istologici hanno evidenziato alterazioni citologiche relative a ciascuna classe di lesione istologica come riportato nel **Grafico 4** in cui notiamo che il 64,66% delle istologie negative derivano da alterazioni citologiche L-SIL, che sono comprese ampiamente anche nella categoria CIN1 (76,19%); nelle lesioni CIN2 la categoria L-SIL (18,52%) diminuisce a scapito di alterazioni citologiche di grado più severo come gli ASC-H (28,4%) e gli H-SIL (34,57%); le lesioni CIN3 comprendono alterazioni di alto grado per circa l'80%, con basse frequenze di L-SIL (15,22%) e quasi nulle di ASC-US (4,35%); i carcinomi derivano da lesioni citologiche di alto grado con un 75% rappresentato dagli ASC-H e il rimanente 25% da H-SIL.

Nel **Grafico 5** sono invece riportate le lesioni istologiche rilevate alla biopsia in relazione all'alterazione citologica al Pap test: la categoria ASC-US è la categoria con la più alta percentuale di negativi (48,68%) e con percentuali di CIN1 pari al 30,26% e di CIN2 uguali al 19,74%; nella categoria L-SIL osserviamo la più alta percentuale di CIN1 (57,33%) seguita da una porzione di campioni senza alterazioni istologiche pari al 32,89%; la categoria ASC-H mostra un calo netto della percentuale dei negativi (9,09%) con un deciso incremento dei casi CIN2 (41,82%) e CIN3 (27,27%); la categoria H-SIL infine non contiene alcun campione negativo, mostrando percentuali basse anche della lesione di basso grado CIN1 (8,47%) a scapito di alte percentuali di lesioni CIN2 (47,46%) e CIN3 (38,98%) con la quasi totalità dei carcinomi che rientrano in tale categoria.

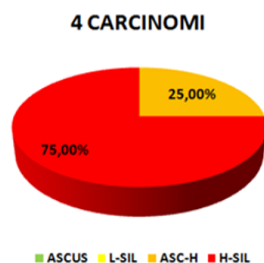
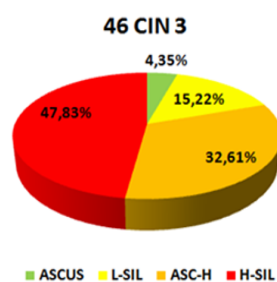
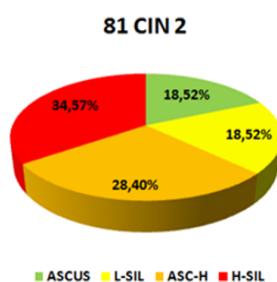
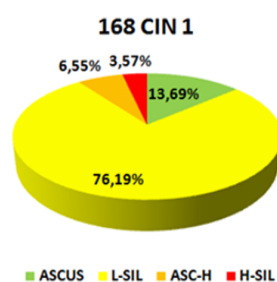
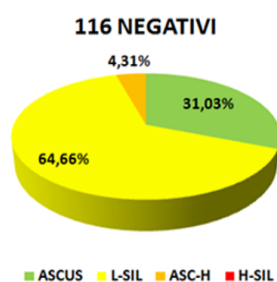


Grafico 4. Diagnosi istologica VS diagnosi citologica.

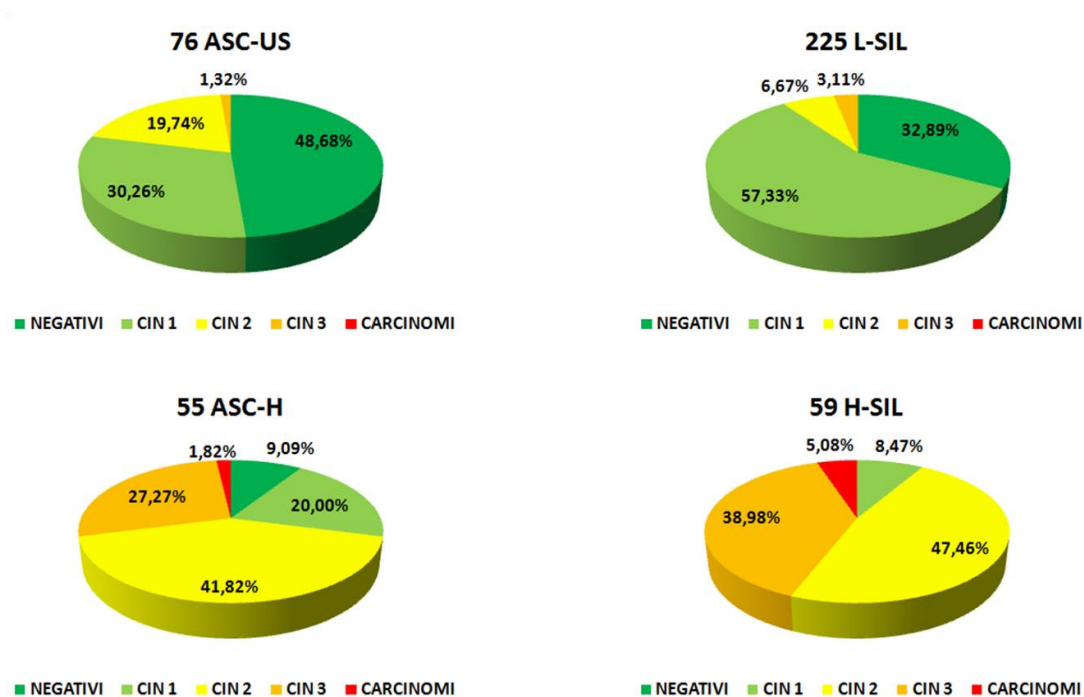


Grafico 5. Diagnosi citologica VS diagnosi istologica.

DISTRIBUZIONE DELLA POSITIVITA' E DEI GENOTIPI RILEVATI NELLE ALTERAZIONI CITOLOGICHE E ISTOLOGICHE

La frequenza di positività nelle lesioni istologiche varia in maniera statisticamente significativa tra le varie lesioni (χ^2 , $p < 0,005$) con un trend in aumento all'aumentare della lesione. La frequenza globale di positivi nei campioni istologici si attesta sul 71%. Nelle istologie negative la percentuale di positività all'HPV è del 45,69%, aumenta nelle lesioni CIN1 arrivando al 79,17%, l'incremento è lieve nelle lesioni CIN2 e CIN 3 con percentuali di positività rispettivamente del 81,48% e del 84,78%, mentre nei carcinomi è raggiunto il 100% di positività (**Graf. 6**).

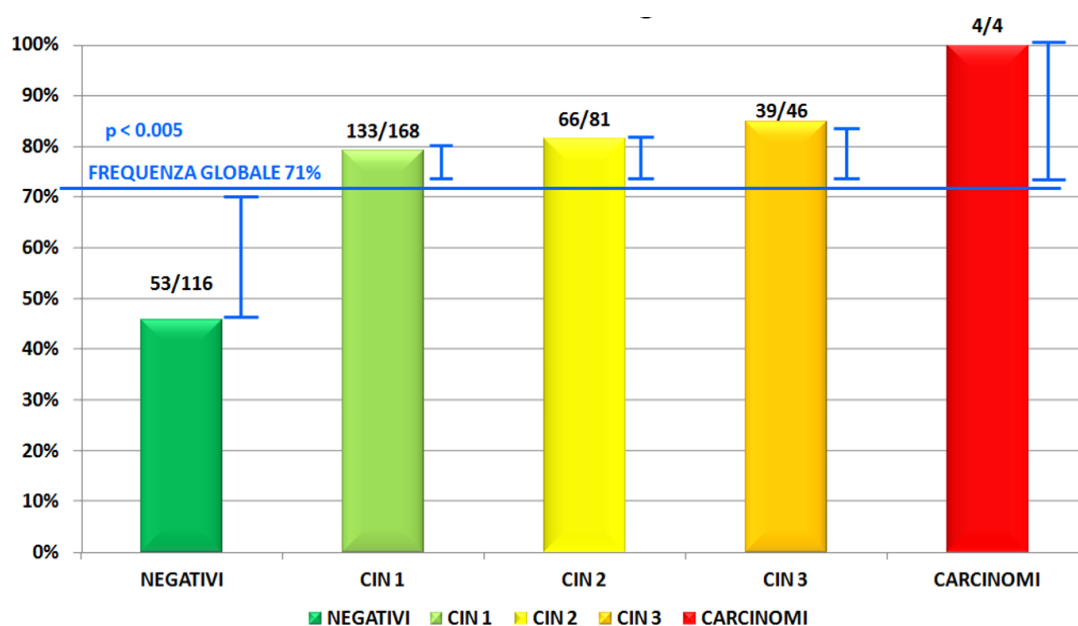


Grafico 6. Frequenza di HPV positivi nei diversi gradi di alterazione istologica

Anche nelle alterazioni citologiche la frequenza di positività varia in maniera statisticamente significativa tra le varie lesioni (χ^2 , $p < 0,005$) con un trend in aumento all'aumentare della gravità della lesione. La frequenza globale di positività si attesta sul 79%. La percentuale di positività nella popolazione di controllo è pari al 38,37%, mentre negli ASC-US sale al 60,53%; negli L-SIL la percentuale è del 77,78%, negli ASC-H è dell'85,45% fino a raggiungere il 100% nelle alterazioni H-SIL (**Graf. 7**).

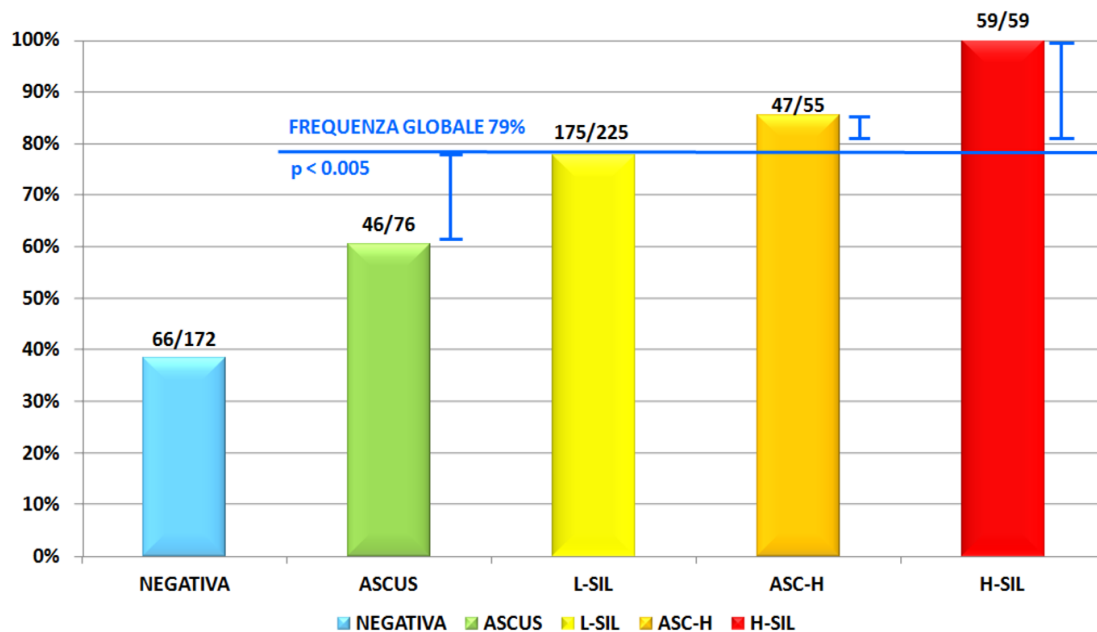


Grafico 7. Frequenza di HPV positivi nei diversi gradi di alterazione citologica

La positività alle classi di rischio di HPV differisce in maniera statisticamente significativa nelle varie classi di lesione istologica (χ^2 , $p < 0,005$). Dal **grafico 8** possiamo osservare una correlazione inversamente proporzionale tra la gravità delle lesioni istologiche e la negatività del test HPV. I genotipi LR-HPV hanno una frequenza massima nelle lesioni CIN1 (20,83%), percentuale che li rende significativi di rischio per tale categoria con un OR pari a 4,74 ed un intervallo di confidenza al 95% (IC 95%) pari a 2,07-10,87. Le frequenze degli LR-HPV nelle lesioni più gravi tendono a diminuire fino a non essere più rilevati nei carcinomi (dati non mostrati). Esiste una correlazione direttamente proporzionale (χ^2 , $p < 0,005$) con la frequenza di HR-HPV, che sono presenti nel 33,62% delle istologie negative, nel 68,45% dei CIN1 (OR = 1,63; IC 95% = 1,08-2,46), nel 72,84% dei CIN2 (OR = 1,87; IC 95% = 1,09-3,19), nell'84,78% dei CIN3 (OR = 4,38; IC 95% = 1,92-10,01) e nel 100% nei carcinomi. I genotipi IR-HPV hanno una frequenza massima nei casi CIN 2 (9,88%) e sono assenti nelle lesioni istologiche più gravi, come CIN3 e carcinomi; gli OR degli IR-HPV non risultano statisticamente significativi per alcun tipo di lesione.

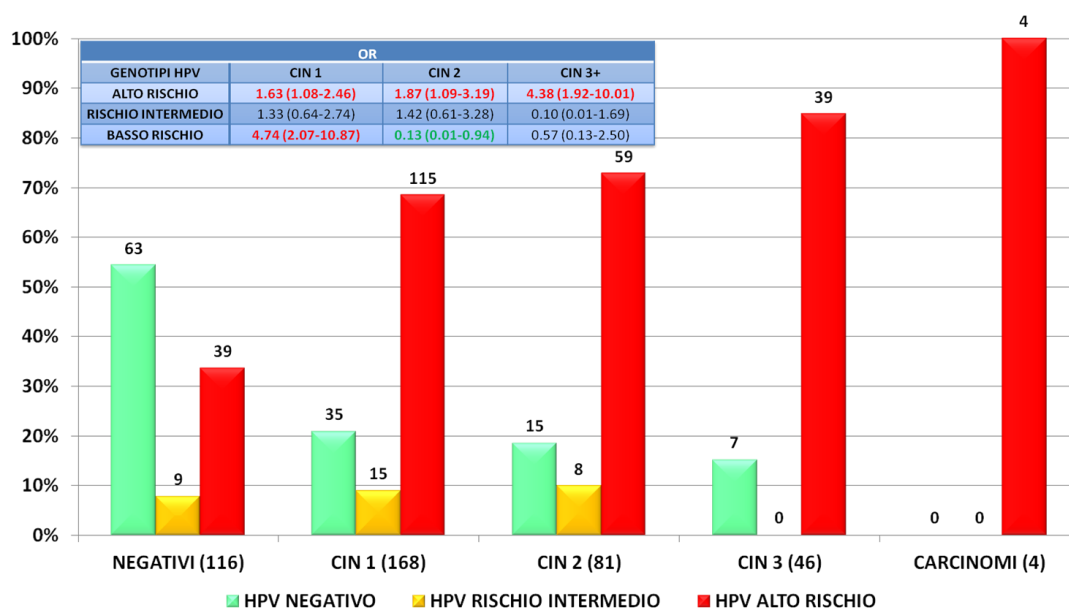


Grafico 8. Distribuzione della positività e dei genotipi rilevata nei diversi gradi di lesione istologica, con relativi OR.

La distribuzione della positività in relazione alle classi di rischio rilevate in citologia differisce in maniera statisticamente significativa (χ^2 , $p < 0,005$) tra le varie alterazioni citologiche. Dal **Grafico 9** possiamo osservare una correlazione inversamente proporzionale fra gravità della lesione e negatività al test HPV e una correlazione direttamente proporzionale (χ^2 , $p < 0,005$) fra grado di alterazione citologica e frequenza di HR-HPV. I genotipi ad alto rischio sono presenti nel 44,74% degli ASC-US, nel 59,56% degli L-SIL, nell'84,45% degli ASC-H (OR = 5,49; IC 95% = 2,55-11,84) e nel 100% degli H-SIL (OR = 120; IC 95% = 7,37-1950). I genotipi IR-HPV sono presenti in tutte le classi di lesioni citologiche analizzate, risultano più rappresentati negli ASC-US con una percentuale pari al 18,42% (OR = 1,95; IC 95% = 1,02-3,72) e negli L-SIL con una percentuale del 15,11% (OR = 1,77; IC 95% = 1,06-2,96). Per quanto riguarda i genotipi a basso rischio sono maggiormente rilevati negli ASC-US (10,53%) e non evidenziano OR significativi per alcun tipo di alterazione citologica.

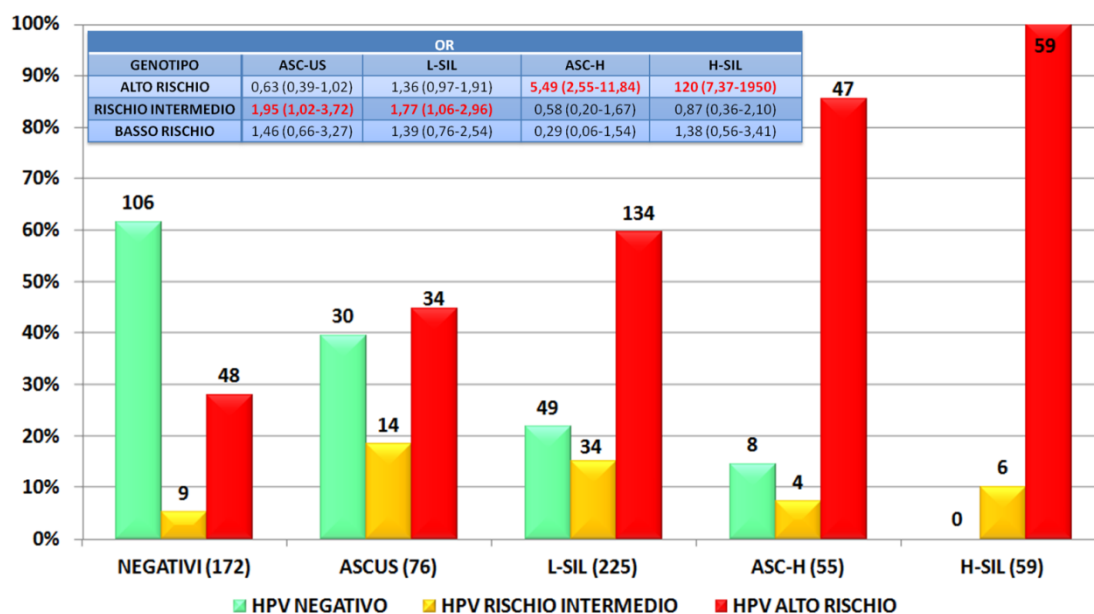


Grafico 9. Distribuzione della positività e dei genotipi rilevata nei diversi gradi di lesione citologica, con relativi OR.

Tra le lesioni istologiche il genotipo più frequentemente rilevato è l'HPV16 con una frequenza globale del 35,25%. La sua frequenza mostra un netto trend in aumento all'aumentare della lesione con una percentuale del 22,64% nelle istologie negative, 21,80% nei CIN1, 50,00% nei CIN2 (OR = 2,55; IC 95% = 1,52-4,26), 69,23% nei CIN3 e 75,00% nei carcinomi con un OR per le lesioni CIN3+ pari a 5,90 (IC 95% = 3,17-10,97). Il secondo genotipo più frequentemente rilevato risulta l'HPV31 con un'incidenza totale del 17,97%. Le lesioni in cui è maggiormente presente sono i CIN1 con il 26,32% (OR = 3,35; IC 95% = 1,82-6,15) e i CIN2 con una frequenza pari al 19,70%; nei CIN3 è praticamente assente con solo 1 caso rilevato, e scompare del tutto nei carcinomi. Il genotipo HPV18 ha una frequenza globale dell'8,81% con un'incidenza del 13,64% rilevata nei CIN2 (OR = 2,33; IC 95% = 1,01-5,44) e del 12,82% nei CIN3. Il terzo genotipo in ordine di frequenza è l'HPV51 (10,85%) e la sua distribuzione pressoché uniforme tra istologia negativa, CIN1 e CIN2 (13,21%; 11,28% e 12,12%) non lo rende significativo di rischio per alcuna lesione istologica. I genotipi a basso rischio HPV6 e HPV11 hanno frequenze globali rispettivamente del 2,37% e al 2,03%, con i valori più alti rilevati nelle istologie negative e nelle lesioni di basso grado (**Graf. 10**).

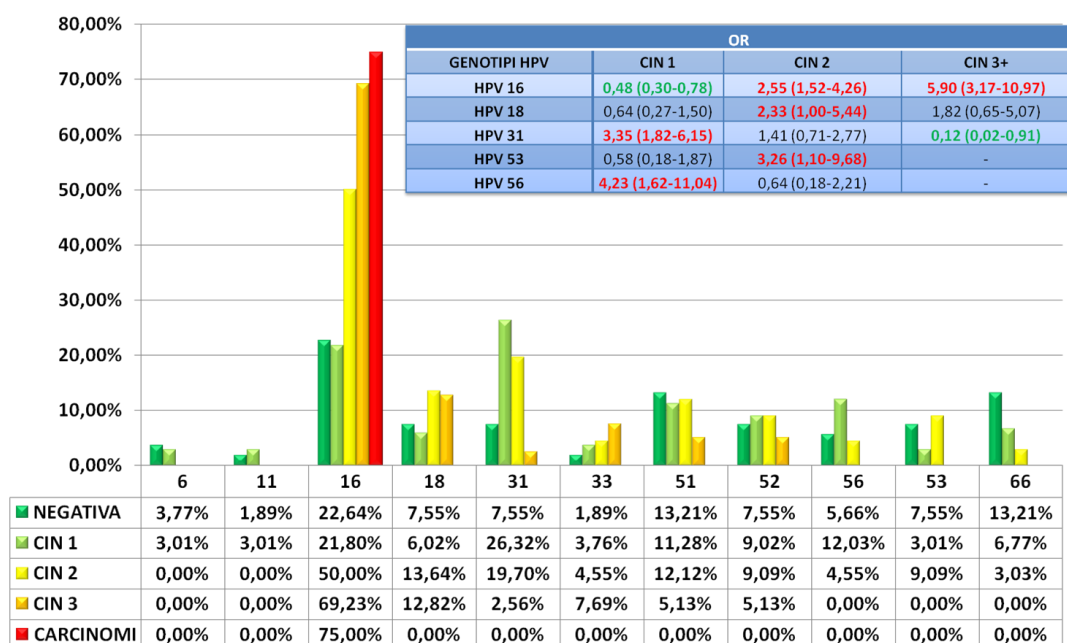


Grafico 10. Distribuzione dei genotipi nelle varie lesioni istologiche, con relativi OR.

Anche nelle lesioni citologiche (**Graf. 11**) il genotipo più frequentemente rilevato è l'HPV16 (22,90%), la percentuale più alta è rilevata negli H-SIL con un valore pari al 40,68% (OR = 4,80; IC 95% = 2,69-8,57), seguono poi gli ASC-H con una percentuale pari al 31,91% (OR = 2,29; IC 95% = 1,20-4,34), mentre la percentuale più bassa risulta nei citologici negativi (12,12%). Il secondo genotipo più frequente è l'HPV31 con una percentuale pari a 12,72% sul totale dei positivi, la frequenza più alta è rilevata negli L-SIL con il 15,43% (OR = 2,01; IC 95% = 1,12-3,60), a seguire troviamo gli ASC-US con il 10,64%. Per quanto riguarda l'HPV18 la sua frequenza totale si attesta sul 7,12% con la presenza più elevata riscontrata nelle lesioni ASC-H con il 14,89% (OR = 3,38; IC 95% = 1,37-8,32) e negli H-SIL con l'11,86% (OR = 3,10; IC 95% = 1,26-7,59). Il terzo genotipo in ordine di frequenza è l'HPV51 (10,18%) e la sua distribuzione rimane uniforme anche nelle lesioni citologiche con differenze minime tra ASC-US, L-SIL e ASC-H (13,04%; 11,43% e 10,64%); la sua frequenza pressoché costante non lo rende significativo di rischio per alcuna lesione citologica. I genotipi a basso rischio coinvolti nel programma di vaccinazione HPV6 e HPV11 hanno frequenze moderatamente basse nel nostro studio (4,33% e 3,31%) con percentuali maggiori rilevate nelle alterazioni ASC-US (8,70%).

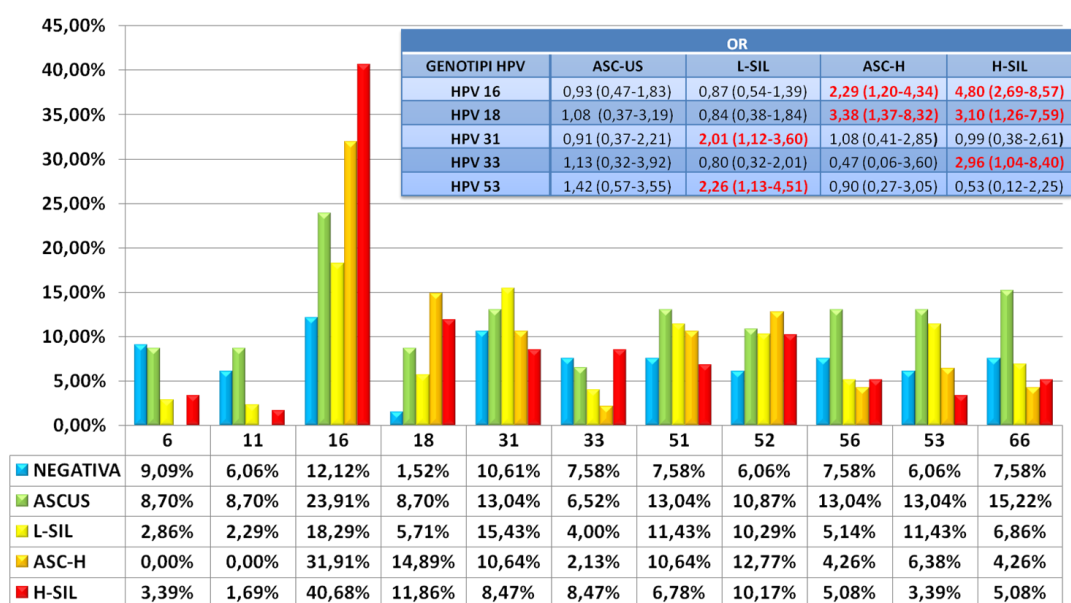


Grafico 11. Distribuzione dei genotipi nelle varie lesioni citologiche, con relativi OR.

Correlando il risultato dell'HPV test effettuato sui campioni citologici con l'alterazione istologica rilevata in sede biotica, si può osservare come in generale il test di biologia molecolare sia caratterizzato da un elevato VPN e da un basso VPP per le lesioni CIN2+ (Tab. 25). Il migliore VPP è risultato quello calcolato considerando la sola positività per i genotipi HPV16 e HPV18, più specifica nel rilevare le lesioni di alto grado (45,7%), mentre il peggiore è quello calcolato considerando tutti i genotipi (19,5%). Il migliore VPN è invece quello relativo alla positività ai 13 principali genotipi ad alto rischio (94%), mentre il peggiore è ancora quello relativo alla positività per tutti i genotipi (87,5%). Sia il VPP che il VPN diminuiscono se si considera la positività ai 13 HR-HPV e ad HPV66 e HPV53. La positività ai soli HPV16 e HPV18 mantiene comunque un buon valore di VPN (90,9%).

	VPP	VPN
Tutti i genotipi	19,49%	87,50%
13 HR-HPV	23,23%	94,29%
13 HR-HPV + HPV66	21,90%	93,10%
13 HR-HPV + HPV 66 e 53	21,30%	92,31%
Solo HPV 16 e 18	45,71%	90,91%

Tabella 25. Valori di VPP e VPN per lesioni CIN2+ in relazione ai genotipi rilevati.

DISTRIBUZIONE DELLE COINFEZIONI NEI DIVERSI GRADI DI LESIONE ISTOLOGICA

La percentuale di infezioni multiple rilevata nei campioni istologici è del 27,46%, con variazioni statisticamente significative tra le varie classi di lesione (χ^2 , $p < 0,005$; **Graf. 12**). Le tipologie di lesione con la più alta percentuale di infezioni multiple sono i CIN2 con una frequenza pari al 40,91% (OR = 2,59; IC 95% = 1,50-4,48) e i CIN1 con il 33,71% (OR = 2,14; IC 95% = 1,31-3,51). La percentuale diminuisce in maniera decisa nelle istologie negative (11,43%) e progressivamente nei CIN3 (7,69%) fino a raggiungere lo zero nei carcinomi, esclusivamente caratterizzati da infezioni singole. Escludendo i campioni positivi ad HPV16 e HPV18, le percentuali delle coinfezioni mostrano ancora differenze statisticamente significative tra le varie classi di lesioni istologiche (χ^2 , $p < 0,025$). La percentuale di tali coinfezioni risulta pari al 26,59%; le lesioni con la percentuale più elevata rimangono i CIN2 (34,78%), seguite dai CIN1 (32,31%). La diminuzione diventa poi importante nelle istologie negative (7,69%) nei CIN3 (16,67%) e nei carcinomi (0%); queste ultime due categorie rappresentano quelle in cui il genotipo 16 ha incidenza più elevata. Le coinfezioni dovute solo esclusivamente ai genotipi ad alto rischio oncogeno sono presenti nelle lesioni istologiche con una percentuale del 22%, con differenze statisticamente significative tra le varie lesioni (χ^2 , $p < 0,025$). La lesione CIN2 si conferma quella con la frequenza di coinfezioni più alta con una percentuale del 30,77%. I CIN1 risultano avere una percentuale di coinfezioni da alto rischio pari al 25,97%, incidenza che diminuisce nelle istologie negative (11,54%), nei CIN3 (7,69%) e nei carcinomi (0%) dove, come già detto, sono rilevate solo infezioni singole.

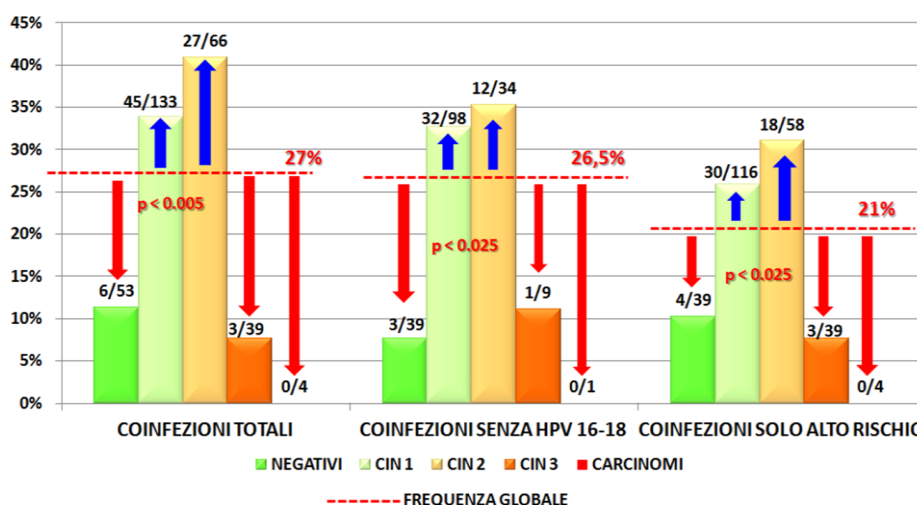


Grafico 12. Frequenza delle infezioni multiple rilevate nei campioni con vari gradi di lesione istologica.

Analizzando la frequenza di coinfezioni divise per classi di rischio in relazione alla gravità dell'alterazione istologica (**Graf. 13**) possiamo notare che le coinfezioni HR-HR aumentano all'aumentare della lesione; nei CIN3 le poche coinfezioni osservate (3/39) sono tutte dovute ad HR-HPV, con 1 genotipo a basso rischio presente in infezione tripla. Gli OR per l'infezione multipla HR-HR risultano pari a 1,93 (IC 95% = 1,09-3,42) per i CIN1 e 2,29 (IC 95% = 1,23-4,29) per i CIN2. Le coinfezioni HR-IR sono rilevanti solo negli stadi iniziali di lesione (CIN 1 e CIN2) dove anche il numero di coinfezioni è elevato, mentre sono basse nei negativi e assenti nei CIN3. Le infezioni HR-LR sono rilevanti solo nelle istologie negative. Dall'analisi degli OR per le infezioni HR-IR e HR-LR non risulta che tali tipi di coinfezioni siano significativamente associati ad alcuna lesione istologica.

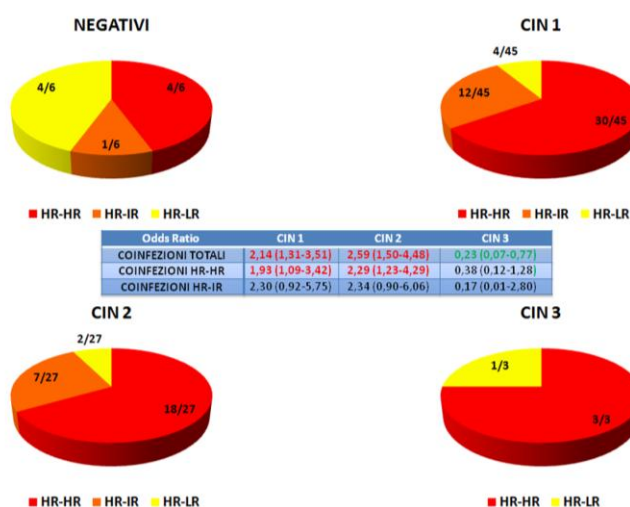


Grafico 13. Distribuzione delle coinfezioni tra LR-IR-HR HPV nei vari gradi di lesione istologica, con relativi OR.

DISTRIBUZIONE DELLE COINFEZIONI NEI DIVERSI GRADI DI LESIONE CITOLOGICA

I risultati dell'analisi della frequenza di coinfezioni totali nei campioni citologici (**Graf. 14**), con un'incidenza globale del 24,94%, evidenziano una differenza statisticamente significativa tra le varie lesioni (χ^2 , $p < 0,005$). La categoria con la percentuale più alta di coinfezioni sono gli ASC-US, che evidenziano una frequenza pari al 56,72% (OR =4,49; IC 95% = 2,59-7,81). Seguono poi gli L-SIL con una percentuale di coinfezioni pari al 25,71% (OR = 1,76; IC 95% = 1,12-2,77) e le citologie negative con il 24,24%. La frequenza delle coinfezioni diminuisce nettamente nelle alterazioni ASC-H e H-SIL con percentuali che si attestano rispettivamente sul 8,51% e 11,86%.

Escludendo i genotipi HPV16 e HPV18, la percentuale di coinfezioni si attesta sul 23,24%, evidenziando una differenza statisticamente significativa tra le varie alterazioni (χ^2 , $p < 0,005$). Si può notare anche che gli ASC-US hanno ancora una percentuale alta con il

55,17% di coinfezioni, dato che evidenzia come in tale categoria le coinfezioni con questi due genotipi siano scarse. I negativi e gli L-SIL mostrano percentuali pari al 21,05% e 20,59%, mentre la frequenza negli ASC-H e negli H-SIL è del 12,00% e 18,92%.

Le coinfezioni dovute esclusivamente ad HR-HPV sono pari al 16,15%, con una differenza statisticamente significativa tra le varie classi di lesione (χ^2 , $p < 0,005$). Gli ASC-US permangono la categoria con la frequenza più alta con un valore del 64,71%, tale aumento è riconducibile ad un'alta percentuale di coinfezioni HR-HR in questa tipologia di alterazioni (vedi **Grafico 15**). Nelle citologie negative il decremento è importante con valori di coinfezioni date dai soli HR-HPV pari al 6,25% contro il 24,24% delle coinfezioni totali. La frequenza negli ASC-H e negli H-SIL risulta rispettivamente pari al 2,13% e al 6,78%.

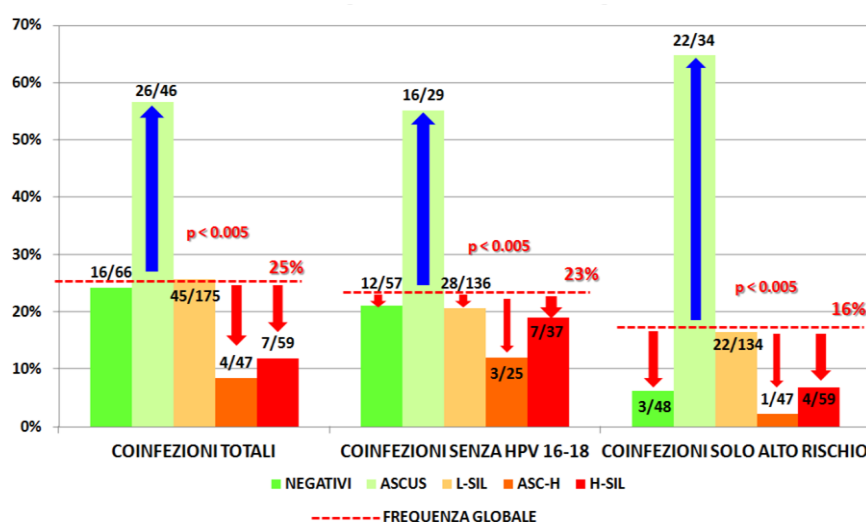
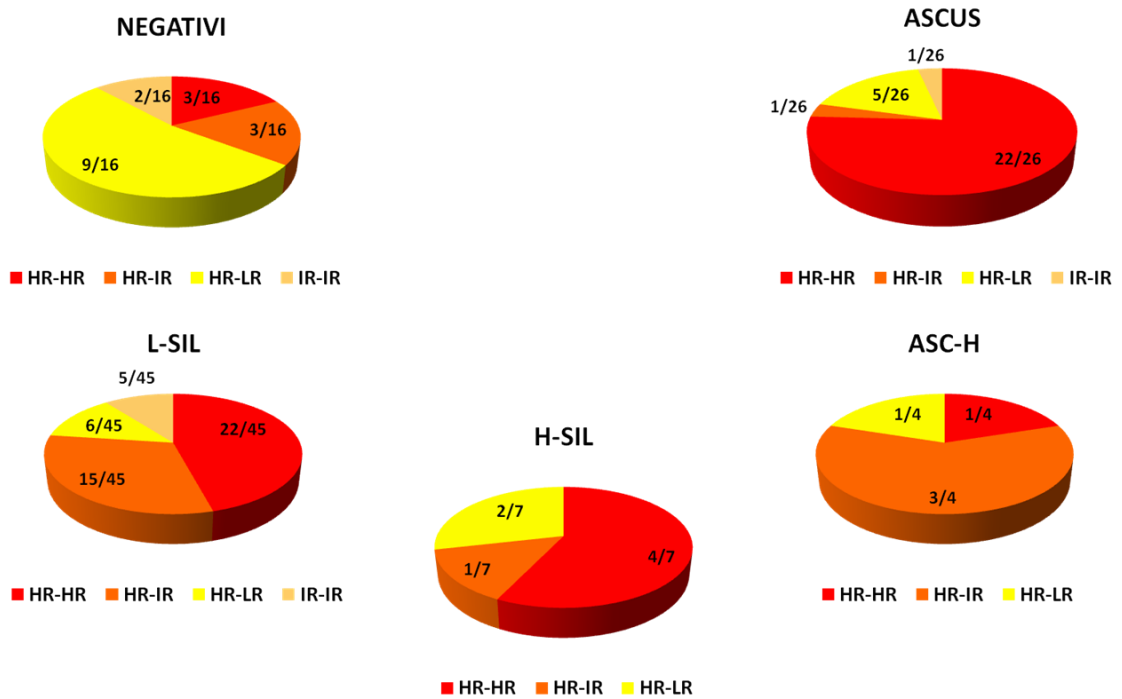


Grafico 14. Frequenza delle infezioni multiple rilevate nei campioni con vari gradi di lesione citologica.

Analizzando la frequenza di coinfezioni divise per classi di rischio in relazione alla gravità dell'alterazione citologica (**Graf. 15**) possiamo affermare che la frequenza di coinfezioni HR-HR più elevata è riscontrata negli ASC-US (OR = 6,53; IC 95% = 3,52-12,12) con 22 casi di coinfezione data da HPV ad alto rischio su 29 coinfezioni totali, ASC-US che comprendono un 29,8% di CIN1 e un 19,87% di CIN2. Negli L-SIL aumenta la porzione delle coinfezioni HR-IR (OR = 3,16; IC = 1,32-7,58), con 15 casi su 45 campioni in coinfezione, L-SIL che comprendono una percentuale maggiore di CIN1 rispetto agli ASC-US (57,11% vs 29,8%) e una minore di CIN 2 (6,67% vs 19,87%). La percentuale più alta di coinfezioni HR-IR la ritroviamo nella categoria ASC-H (3/4), ma tali alterazioni mostrano pochi campioni con coinfezioni (8,51%). Stesso discorso vale per le alterazioni

H-SIL che presentano un'elevata percentuale di coinfezioni HR-HR (4/7), ma su un background di coinfezioni totali molto basso pari all'11,86%.



Odds Ratio	ASC-US	L-SIL	ASC-H	H-SIL
COINFEZIONI TOTALI	4,49 (2,59-7,81)	1,76 (1,12-2,77)	0,37 (0,13-1,04)	0,65 (0,28-1,47)
COINFEZIONI HR-HR	6,53 (3,52-12,12)	1,20 (0,67-2,14)	0,17 (0,02-1,29)	0,73 (0,25-2,09)
COINFEZIONI HR-IR	0,30 (0,04-2,22)	3,16 (1,32-7,58)	1,48 (0,42-5,14)	0,40 (0,05-3,00)
COINFEZIONI IR-IR	0,96 (0,12-7,91)	2,72 (0,64-11,49)	0,56 (0,03-9,76)	0,51 (0,03-9,03)

Grafico 15. Distribuzione delle coinfezioni tra LR-IR-HR HPV nei vari gradi di lesione citologica, con relativi OR.

VALUTAZIONE DELLA CARICA VIRALE E DEL GRADO DI INTEGRAZIONE DELL'HPV 16

In ogni seduta di amplificazione è stata generata una curva standard per il gene E2 (**Fig. 15**) e per il gene E6 (**Fig. 16**).

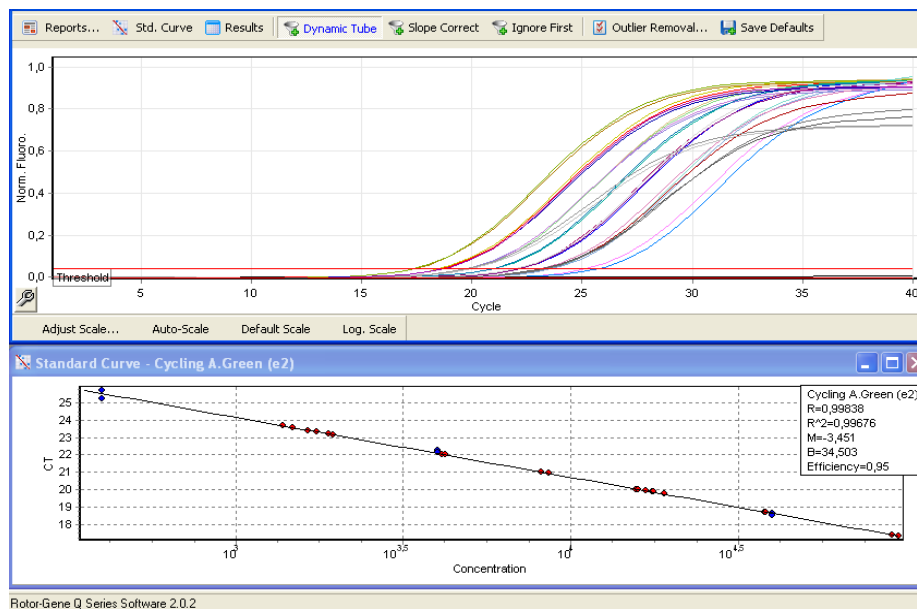


Figura 15. Curva standard gene E2.

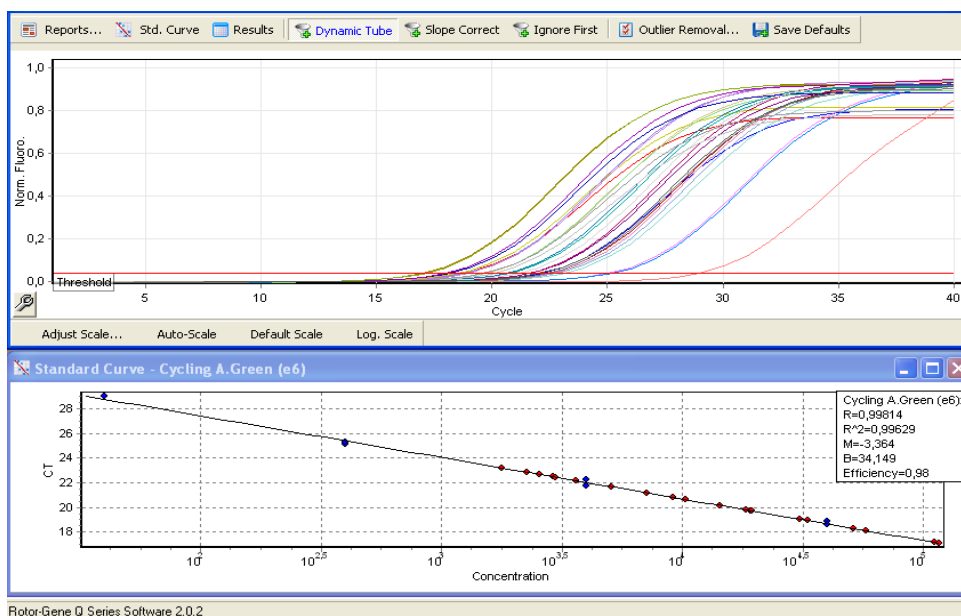


Figura 16. Curva standard gene E6.

Dall'analisi della curva di melting è risultato che gli amplificati sia per la regione E2 (**Fig. 17**) che per la regione E6 (**Fig. 18**) sono specifici.

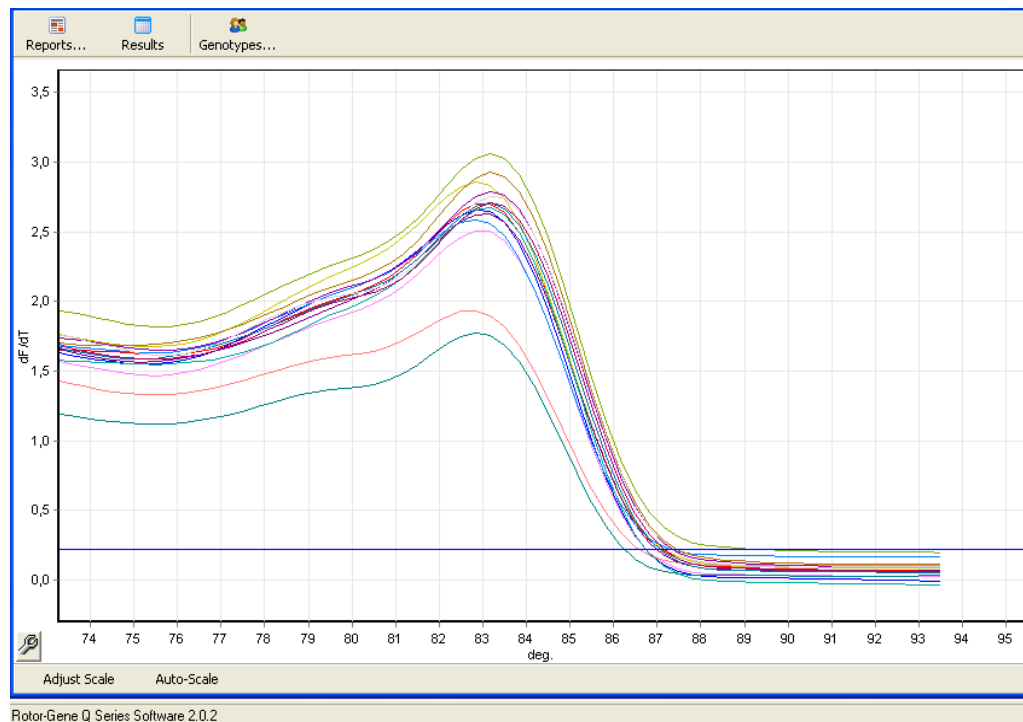


Figura 17. Curva di melt gene E2.

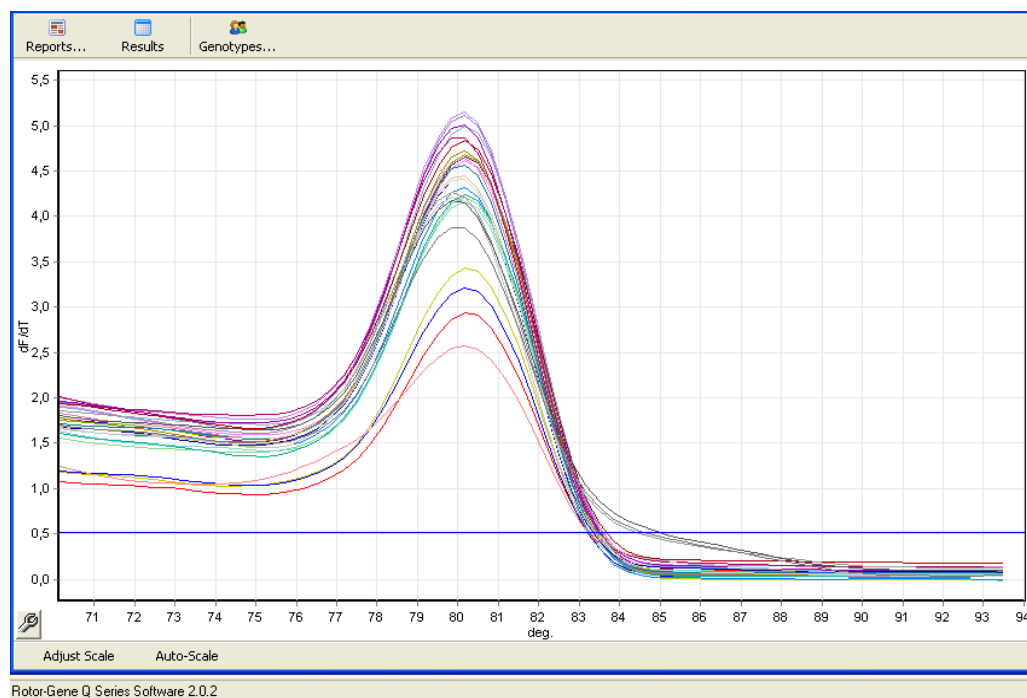


Figura 18. Curva di melt gene E6.

Il limite minimo di rilevazione per l'HPV16 testato con lo standard della WHO è risultato essere pari a 9,47 copie di DNA virale/ μ l sia per la regione E2 che per la regione E6. Il range di cariche verificate che il metodo può discriminare in maniera efficiente vanno dalle 9,47 alle 9.470 copie/ μ l; per le cariche sopra le 9.470 copie/ μ l si considera la

quantificazione affidabile come descritto nello studio di *Peitsaro e collaboratori (2002)*, che riportano il mantenimento della linearità fino a 5×10^7 copie. Dall'analisi della ripetibilità intra-saggio possiamo affermare che il coefficiente di variazione per i geni E2 ed E6 copre un range dal 2,1% al 7,6%, con una variabilità maggiore riscontrata per il gene E2 alle concentrazioni dello standard per l'HPV16 pari a 94,7 copie/μl e 9,47 copie/μl. Per quel che riguarda la ripetibilità inter-saggio il coefficiente di variazione evidenzia valori dall'1,7% al 9,4%. Il CV calcolato per tutti i punti della curva, sia intra-saggio che inter-saggio, è stato sempre inferiore al 10%.

VALUTAZIONE DELLA CARICA VIRALE NEI CAMPIONI CITOLOGICI

Sono stati analizzati 90 campioni citologici positivi all'HPV16, distribuiti nelle varie lesioni citologiche (8 citologici negativi, 11 ASC-US, 32 L-SIL, 15 ASC-H e 24 H-SIL). La carica virale più alta è stata rilevata negli L-SIL con una media di $273,16 \pm 57,16$ copie/cell; seguono poi gli ASC-US e gli H-SIL con cariche medie rispettivamente di $59,76 \pm 25,03$ copie/cell e $43,49 \pm 11,15$ copie/cell. La carica virale più bassa risulta nei campioni citologici negativi con un valore medio di $0,35 \pm 0,06$ copie/cell; mentre negli ASC-H la carica è pari a $5,89 \pm 1,41$ (**Graf. 16**). Dall'analisi statistica emerge che la carica non correla con il grado di lesione ($R^2 = 0,1146$), ma si evidenzia come la carica nelle citologie negative si differenzi in maniera statisticamente significativa con quella misurata negli ASC-US (t di Student, $p < 0.05$), negli L-SIL (t di Student, $p < 0.025$) e negli ASC-H (t di Student, $p < 0.005$). La carica rilevata negli L-SIL differisce in maniera statisticamente significativa anche da quella evidenziata negli ASC-H e H-SIL (t di Student, $p < 0.025$), mentre la carica degli ASC-H si differenzia, oltre da quella delle citologie negative, da quella degli ASC-US e H-SIL (t di Student, $p < 0.01$). Nel **Grafico 17** possiamo valutare la dispersione del dato ottenuto per la carica virale in ogni grado di lesione, con le alterazioni ASC-US ed L-SIL che coprono un range di valori ampio.

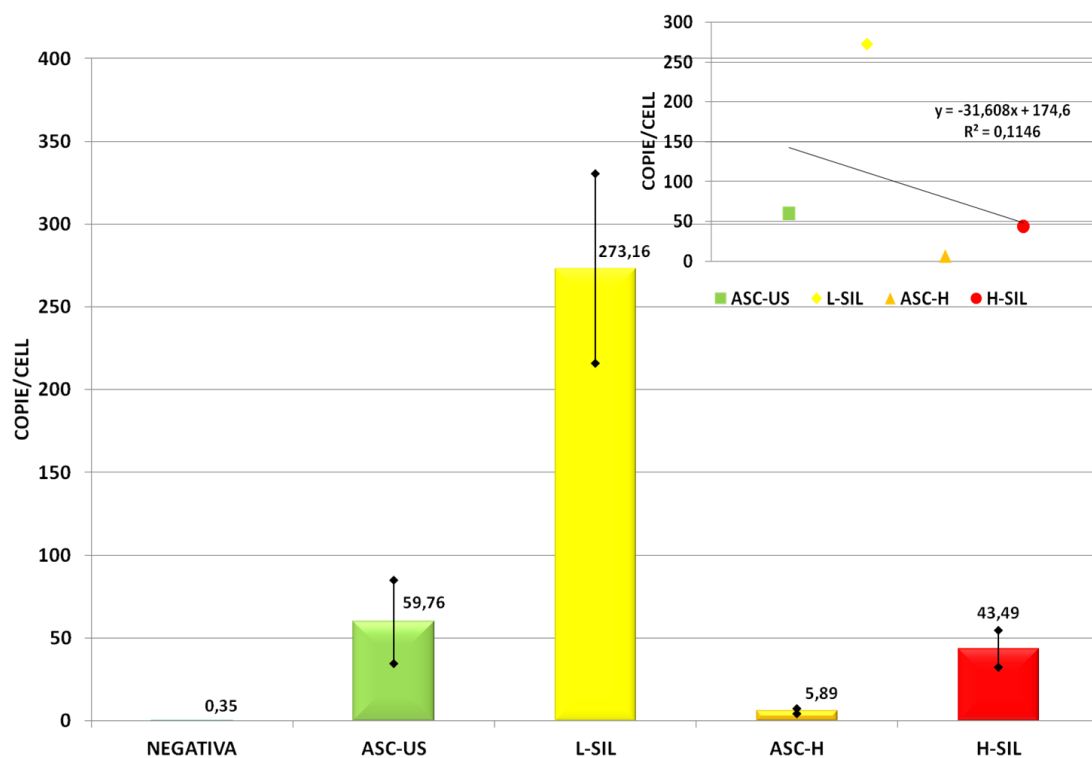


Grafico 16. Distribuzione e correlazione della carica virale con il grado di alterazione citologica.

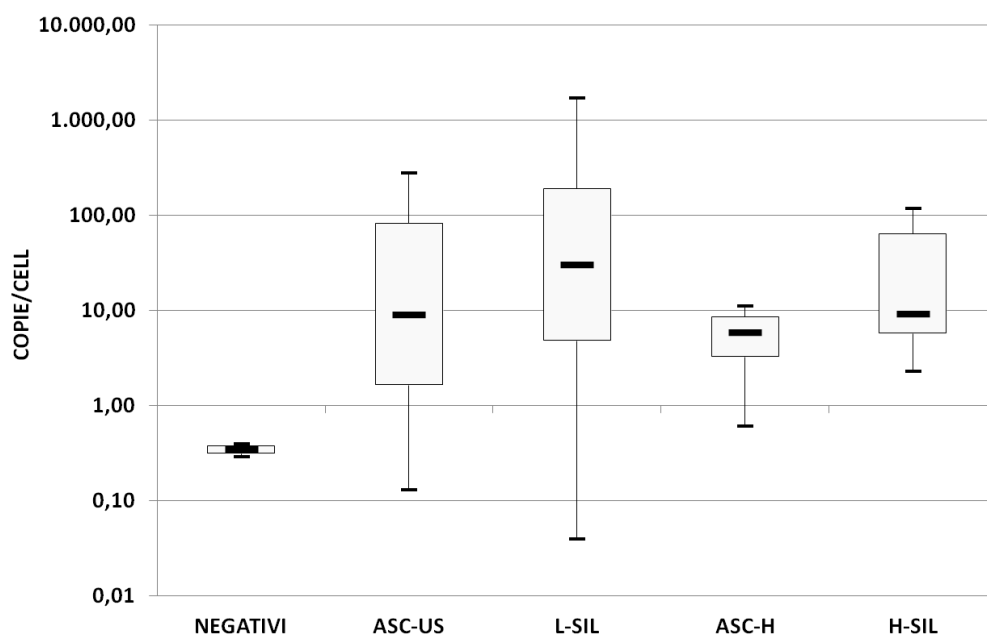


Grafico 17. Carica virale nei vari gradi di alterazione citologica. I limiti superiore e inferiore delle box rappresentano rispettivamente il 75° e il 25° percentile. La linea nera all'interno della scatola rappresenta la mediana; le barre rappresentano il valore minimo e massimo.

Correlando la carica virale delle alterazioni citologiche HPV16 positive al grado di lesione istologica corrispondente (10 negativi, 23 CIN1, 26 CIN2, 20 CIN3, 3 carcinomi; **Graf. 18**) notiamo che: la carica virale più alta corrisponde alla lesione CIN1 con $426,9 \pm 139,94$ copie/cell (lesione che deriva al 76% da L-SIL); la carica decresce all'aumentare della gravità della lesione con $37,8 \pm 8,26$ copie/cell e $3,8 \pm 0,73$ copie/cell rispettivamente per i CIN2 e CIN3+; nelle lesioni CIN1, CIN2 e CIN3+ le copie di E6 mostrano un trend in diminuzione ($R^2 = 0,8098$). Il **Grafico 19** mostra la dispersione del dato ottenuto per la carica virale in ogni grado di lesione, in cui possiamo notare un ampio range di valori di cariche per le istologie negative, per i CIN1 e per i CIN2 (categorie che derivano per buona parte da alterazioni citologiche L-SIL e ASC-US).

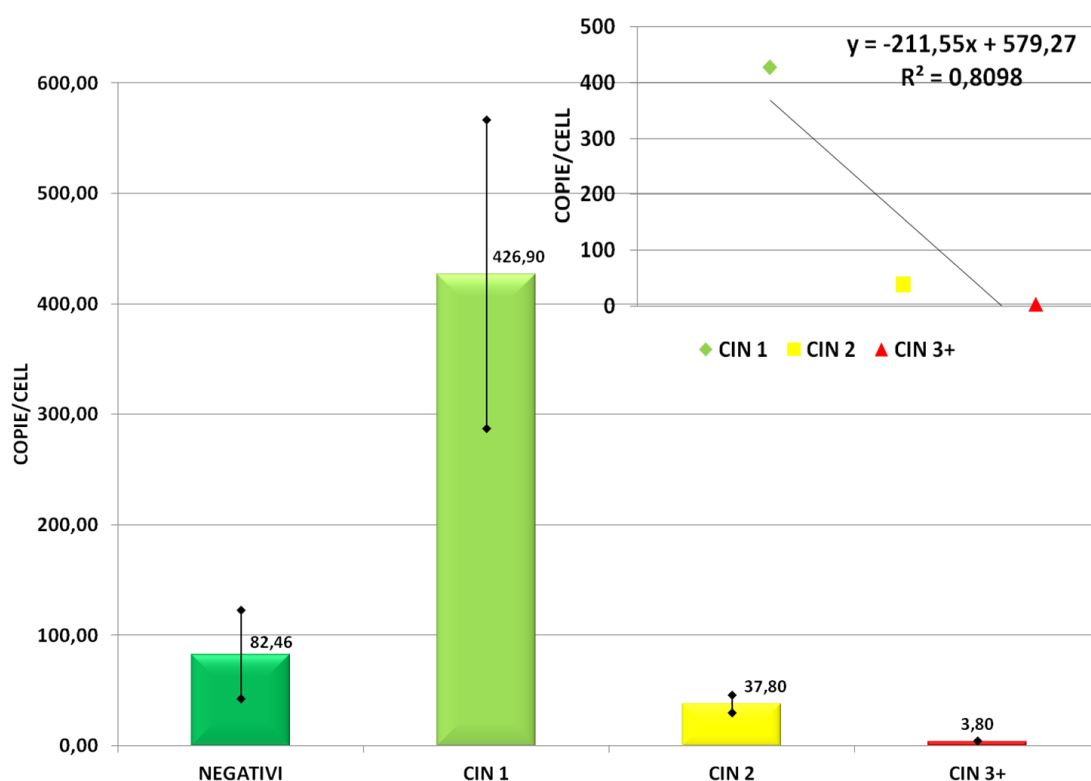


Grafico 18. Distribuzione e correlazione della carica virale nelle lesioni istologiche corrispondenti ai campioni citologici HPV16 positivi.

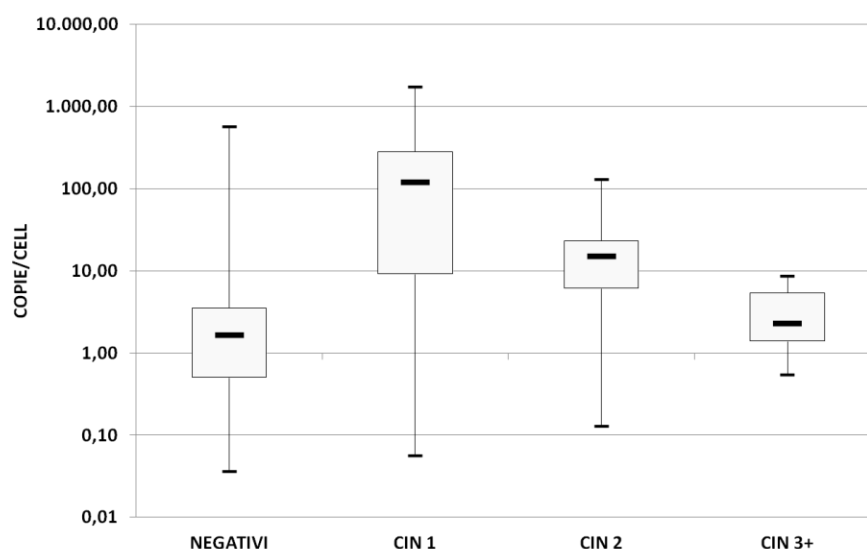


Grafico 19. Carica virale nelle lesioni istologiche corrispondenti ai campioni citologici HPV16 positivi. I limiti superiore e inferiore delle box rappresentano rispettivamente il 75° e il 25° percentile. La linea nera all'interno della scatola rappresenta la mediana; le barre rappresentano il valore minimo e massimo.

Dall'analisi statistica con il *t* di Student si evidenzia che le lesioni CIN3+ si differenziano significativamente dai negativi ($p < 0,025$), CIN1 ($p < 0,005$) e CIN2 ($p < 0,0005$); un'ulteriore differenza significativa risulta tra la carica delle lesioni CIN1 e quella delle lesioni CIN2 ($p < 0,005$).

VALUTAZIONE DELLA CARICA VIRALE NEI CAMPIONI ISTOLOGICI

Sono stati valutati 104 campioni istologici positivi all'HPV16 (12 istologici negativi, 29 CIN1, 33 CIN2, 27 CIN3 e 3 carcinomi). La carica virale più alta è stata rilevata (**Graf. 20**) nelle lesioni CIN1 con una media di $669,02 \pm 271,03$ copie/cell, mentre quella rilevata nei carcinomi è paragonabile a quella dei campioni senza alterazioni che mostrano il valore più basso ($38,78 \pm 13,26$ vs $30,21 \pm 8,11$ copie/cell). La carica virale nei CIN2 e dei CIN3 è pari a $350,34 \pm 90,70$ e $160,17 \pm 48,39$. Dall'analisi statistica emerge che: correlando la carica al grado di lesione si nota un trend in diminuzione all'aumentare della gravità delle lesioni ($R^2 = 0,9562$); la carica dei campioni negativi si differenzia in maniera significativa dai CIN2 (*t* di Student, $p < 0,025$) e dai CIN3 (*t* di Student, $p < 0,05$); la carica virale dei CIN3 differisce anche in maniera significativa dai CIN1 (*t* di Student, $p < 0,05$) e dai CIN2 (*t* di Student, $p < 0,05$).

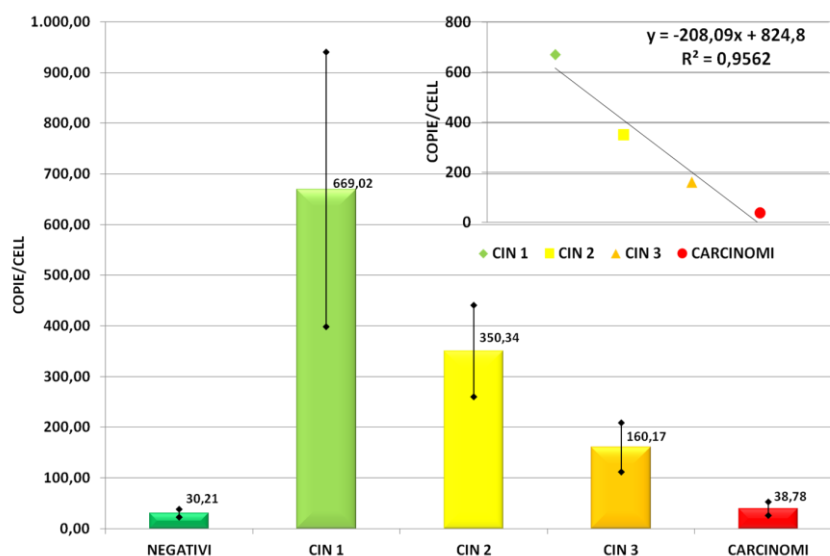


Grafico 20. Distribuzione e correlazione della carica virale con il grado di lesione istologica.

Nel **Grafico 21** viene mostrata la dispersione dei dati relativi alla carica virale nei campioni istologici, con le lesioni CIN1 che evidenziano la mediana più alta e una variabilità maggiore nelle copie di E6 rispetto agli altri gradi di lesione.

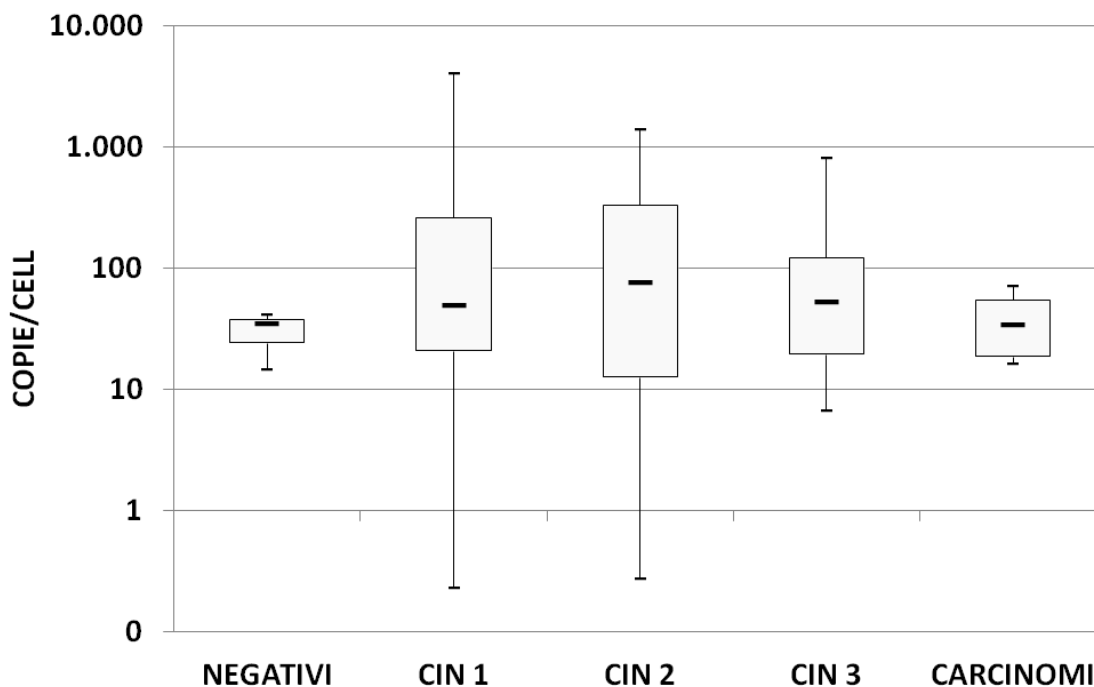


Grafico 21. Carica virale nelle lesioni istologiche. I limiti superiore e inferiore delle box rappresentano rispettivamente il 75° e il 25° percentile. La linea nera all'interno della scatola rappresenta la mediana; le barre rappresentano il valore minimo e massimo.

Dai nostri dati emerge inoltre che le cariche misurate nei campioni istologici sono superiori di circa 100 volte rispetto a quelle misurate nei rispettivi campioni citologici, ma direttamente correlate ($R^2 = 0,99$).

VALUTAZIONE DEL GRADO DI INTEGRAZIONE NEI CAMPIONI CITOLOGICI

L'integrazione è stata espressa come percentuale di copie di E6 integrate sulla carica virale totale, calcolata come $\frac{\text{copie E6} - \text{copie E2}}{\text{copie E6}} * 100$. I 90 campioni citologici positivi all'HPV16, distribuiti nelle varie lesioni citologiche (8 citologici negativi, 11 ASC-US, 32 L-SIL, 15 ASC-H e 24 H-SIL) sono stati testati per valutare il grado di integrazione del DNA virale nel genoma ospite (**Graf. 22**). I risultati evidenziano la più alta percentuale di integrazione nelle alterazioni ASC-US con il $40,82\% \pm 10,86\%$, mentre la percentuale minore è rilevata negli L-SIL con il $21,33\% \pm 3,66\%$. Le categorie ASC-H e H-SIL mostrano percentuali paragonabili di integrazione con valori che si attestano rispettivamente sul $26,1\% \pm 5,01\%$ e $25,78\% \pm 2,10\%$; le citologie negative, invece, evidenziano valori di integrazione pari al $31,16\% \pm 6,26\%$. L'analisi statistica, effettuata con il t di Student, evidenzia che il grado di integrazione degli ASC-US differisce significativamente da quello misurato negli L-SIL ($p < 0,025$) e negli H-SIL ($p < 0,05$). La percentuale di copie di E6 integrate non correla in maniera statisticamente significativa con la gravità dell'alterazione citologica ($R^2 = 0,3764$).

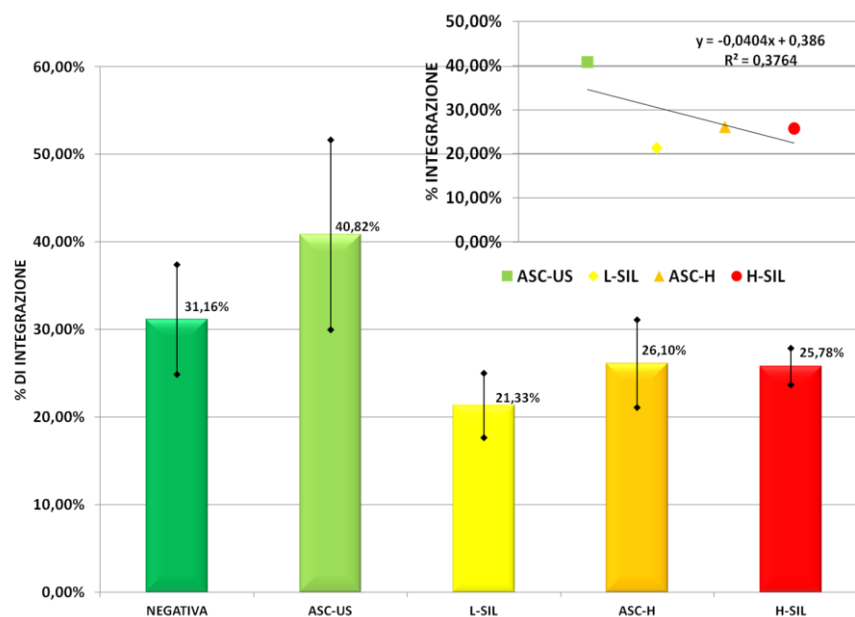


Grafico 22. Distribuzione della % di integrazione con il grado di alterazione citologica.

Il **Grafico 23** mostra, invece, la dispersione dei dati ottenuti sul grado di integrazione per ogni grado di alterazione citologica; come possiamo notare il più ampio range di valori lo si riscontra nelle citologie negative e nelle lesioni di basso grado, categorie che contengono percentuali variabili di istologie negative, CIN1 e CIN2.

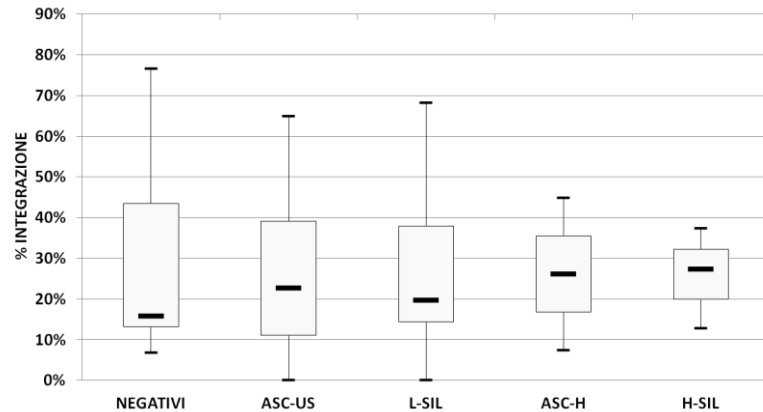


Grafico 23. Percentuale di integrazione nei vari gradi di alterazione citologica. I limiti superiore e inferiore delle box rappresentano rispettivamente il 75° e il 25° percentile. La linea nera all'interno della scatola rappresenta la mediana; le barre rappresentano il valore minimo e massimo.

I campioni citologici HPV16 positivi con alterazioni sono stati correlati alla lesione istologica corrispondente (**Graf. 24**), come già descritto precedentemente per la carica virale. Le percentuali di integrazione si attestano per tutte le lesioni tra il 30 e il 40%, con il grado di integrazione più alto rilevato nei CIN2 (40,04% \pm 5,75%) e il più basso rilevato nei CIN1 (29,87% \pm 5,46%). Le istologie negative mostrano una percentuale di integrazione pari al 32,35% \pm 9,3% mentre i CIN3+ pari al 37,46% \pm 1,23%. In questo caso l'analisi statistica effettuata con il t di Student non mostra significative variazioni tra i vari gradi di lesione istologica e non esiste alcuna correlazione tra il grado di integrazione e la gravità della lesione ($R^2 = 0,5151$).

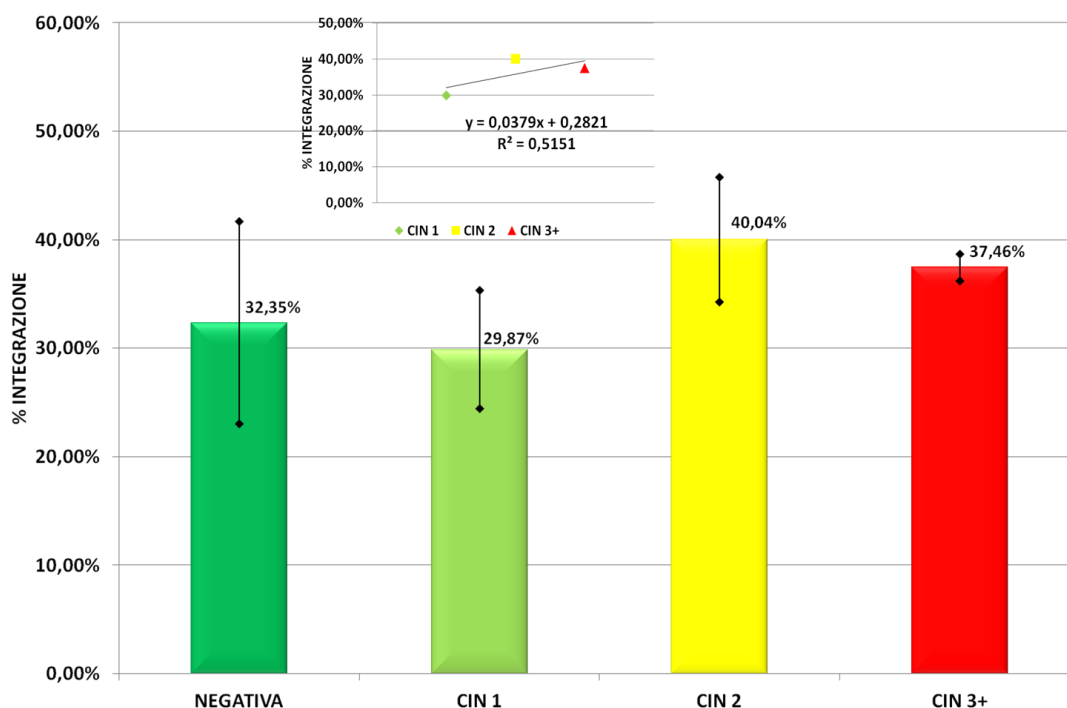


Grafico 24. Distribuzione e correlazione della % di integrazione nelle lesioni istologiche corrispondenti ai campioni citologici HPV16 positivi.

Il **Grafico 25** mostra la dispersione dei dati relativi alla % di integrazione rilevata nelle varie classi di lesione, grazie al quale possiamo notare l'ampio range di valori misurati per l'integrazione nelle lesioni CIN2 e nelle istologie negative.

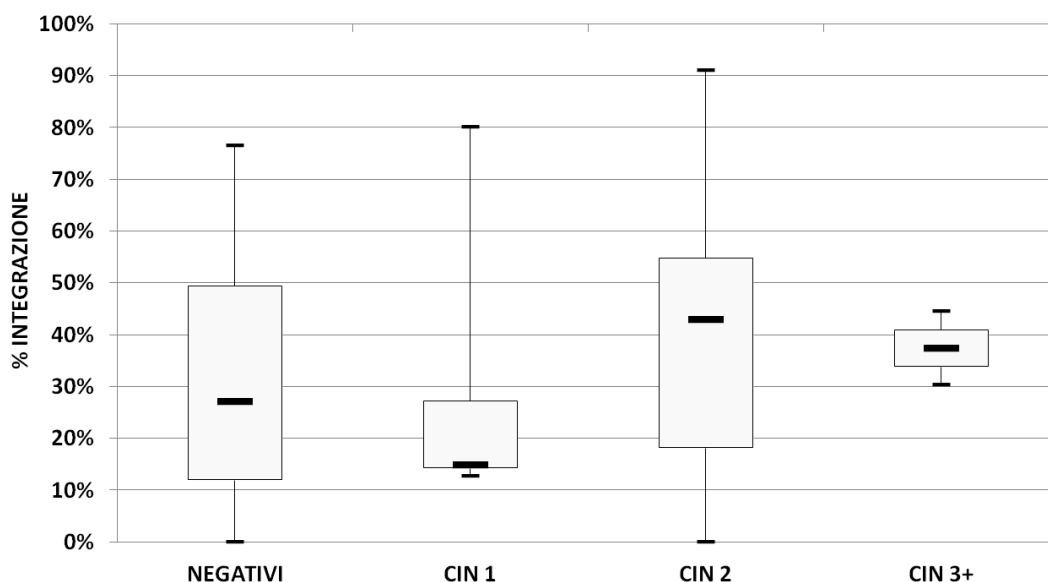


Grafico 25. Percentuale di integrazione nelle lesioni istologiche corrispondenti ai campioni citologici HPV16 positivi. I limiti superiore e inferiore delle box rappresentano rispettivamente il 75° e il 25° percentile. La linea nera all'interno della scatola rappresenta la mediana; le barre rappresentano il valore minimo e massimo.

VALUTAZIONE DEL GRADO DI INTEGRAZIONE NEI CAMPIONI ISTOLOGICI

La percentuale d'integrazione più elevata è risultata nei carcinomi con una percentuale del $49,88\% \pm 8,87\%$, mentre il valore più basso è associato al grado di lesione CIN1 ($33,09\% \pm 3,24\%$), seguito dalle istologie negative con il $34,45\% \pm 5,06\%$ (**Graf. 26**). Differenze minime, che non raggiungono la significatività statistica, sono evidenziate nelle percentuali di integrazione dei CIN2 ($48,49\% \pm 4,28\%$) e dei CIN3 ($47,56\% \pm 2,83\%$). La categoria CIN1 mostra variazioni statisticamente significative nel grado di integrazione rispetto ai CIN3 (t di Student, $p < 0,001$) e rispetto ai CIN2 (t di Student, $p < 0,005$). Le istologie negative, per quel che riguarda la % di integrazione, si differenziano in maniera staticamente significativa dalle lesioni CIN3 (t di Student, $p < 0,025$). Possiamo inoltre affermare che il grado di integrazione non correla con la gravità della lesione ($R^2 = 0,6639$).

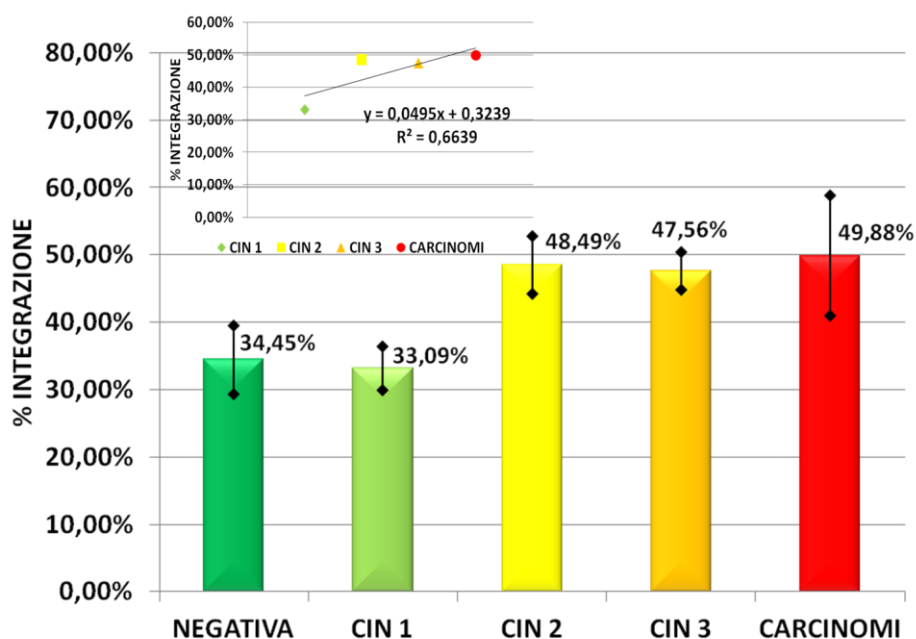


Grafico 26. Distribuzione e correlazione della % di integrazione nelle lesioni istologiche.

Nel **Grafico 27** è mostrata la dispersione dei dati relativi al grado di integrazione misurato nei vari gradi di lesione istologica, dove si può notare come la % di DNA virale integrato copra valori molto ampi nelle lesioni di basso grado e nelle istologie negative.

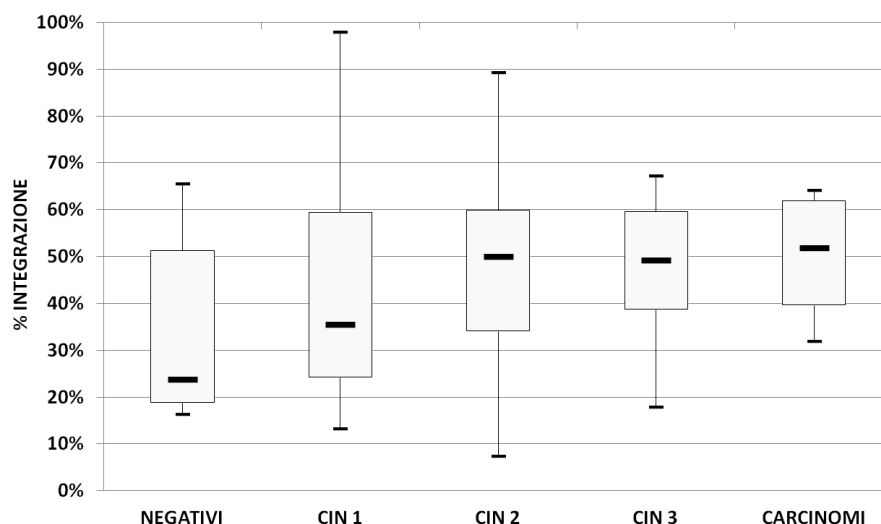


Grafico 27. Percentuale di integrazione nelle lesioni istologiche. I limiti superiore e inferiore delle box rappresentano rispettivamente il 75° e il 25° percentile. La linea nera all'interno della scatola rappresenta la mediana; le barre rappresentano il valore minimo e massimo.

CORRELAZIONE TRA CARICA E INTEGRAZIONE

È stato osservato nei campioni citologici che i campioni aventi gradi di integrazione virale superiori al 50% sono associati significativamente a cariche inferiori a 1 copia/cell (χ^2 , $p < 0,005$). Per quanto riguarda i campioni istologici non esiste alcuna correlazione statisticamente significativa tra carica e integrazione. Si può però notare che, suddividendo i valori di carica e integrazione per la gravità della lesione istologica (**Graf. 28**), la media della carica virale e la media del grado di integrazione per ogni categoria non si raggiunge ugualmente la significatività statistica, ma si rileva un trend in diminuzione dell'integrazione all'aumentare della carica ($R^2 = 0,7479$).

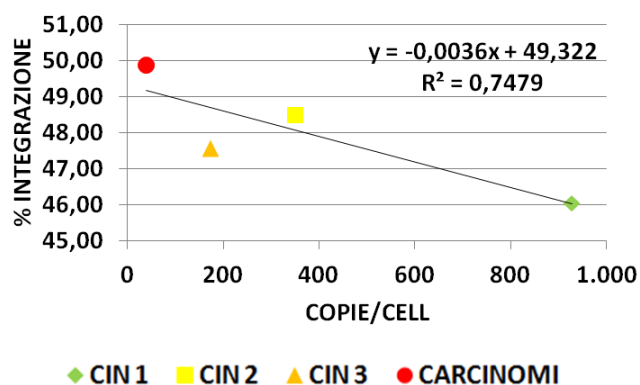


Grafico 28. Correlazione carica VS % di integrazione tra le varie classi di lesioni istologica.

DISCUSSIONE

Il carcinoma della cervice uterina è, a livello mondiale, il secondo tumore maligno per incidenza nella donna; il suo sviluppo è un esito raro di un'infezione molto frequente ed è un processo lento che richiede molti anni affinché una lesione precancerosa si sviluppi in una forma invasiva. L'introduzione di programmi di screening basati sul Pap test ha notevolmente ridotto l'incidenza di questa patologia: la lentezza del processo di cancerogenesi consente infatti di individuare e trattare precocemente le eventuali lesioni CIN2+ prima che si formi il cancro vero e proprio. Finora la pietra miliare dello screening del carcinoma cervicale è stata la citologia tradizionale mediante la quale, secondo i dati dell'IARC, l'incidenza del cancro nelle donne che si sottopongono regolarmente allo screening ogni 3-5 anni può essere ridotta dell'80% (IARC, 2005). L'HPV DNA test è stato inizialmente introdotto per il triage delle donne con citologia ASC-US e L-SIL e per il follow-up post-trattamento delle lesioni CIN2+, allo scopo di ridurre il numero di donne inviate a colposcopia e per identificare eventuali recidive che necessitano di ulteriori trattamenti. Numerosi studi condotti in Paesi diversi su un numero notevole di donne hanno confermato la maggiore sensibilità nel rilevare lesioni CIN2+ dell'HPV test rispetto alla citologia tradizionale (Cuzick *et al*, 2003; Cuzick *et al*, 2006; Ronco *et al*, 2012), aumentando l'intervallo di screening da 3 a 5 anni per coloro che risultano negative al test HPV. Questi dati hanno portato Ronco e collaboratori (2012) a stilare delle nuove linee guida italiane per lo screening del cervicocarcinoma in cui l'HPV DNA test è considerato il test primario, nella fascia di età > 35 anni, mantenendo il Pap test nella fascia 25-34 anni. I risultati degli studi sperimentali dimostrano che il test HPV oltre ad avere un'elevata sensibilità ha anche una bassa specificità, che comporterebbe un elevato numero di donne inviate direttamente a colposcopia, con una marcata diminuzione del VPP del test HPV. La diminuita specificità si basa essenzialmente su due fattori: a) il test HPV, di norma, si basa sulla rilevazione dei 13/14 HR-HPV che come ampiamente dimostrato non hanno tutti lo stesso potere oncogeno (Muñoz *et al.*, 2004; Saslow *et al.*, 2012); b) il test HPV non discrimina tra infezioni transienti e persistenti (Manawapat *et al.*, 2012; Schmitt *et al.*, 2013). Tra le donne HPV positive solo un numero limitato presenterà una lesione di alto grado e inviare a direttamente a colposcopia tutte le donne HPV positive avrebbe come conseguenza un aumento dei costi e dei trattamenti non necessari, con risvolti psicologici non indifferenti per le pazienti. Da qui nasce la necessità di identificare, tra le pazienti positive al test HPV, quelle che hanno un alto rischio di progressione neoplastica (lesioni

CIN2+). La citologia è stata proposta come test di triage per stratificare il rischio nelle donne HPV positive, considerata in un algoritmo che preveda per primo il test più sensibile (HPV test) e poi quello più specifico (Pap test). Un'altra alternativa proposta è la genotipizzazione completa o parziale (solo HPV16 e 18) delle donne HPV positive. Dalla letteratura è ben noto come il 70% dei carcinomi sia dovuto all'HPV16 e 18 (*Muñoz et al., 2004; Saslow et al., 2012*) e come le donne positive a questi due genotipi abbiano un aumento di incidenza di lesioni di alto grado rispetto a donne positive ad altri HR-HPV (*Schlecht et al., 2001*). Dai nostri dati emerge infatti che il miglior VPP per lesioni CIN2+ risulta quando vengono considerati solo i genotipi 16 e 18 (45,71%, **Tab. 25**). D'altro canto, dai nostri dati risulta che il più alto VPN per lesioni CIN2+ (94,29%) è associato alla positività per i 13 HR-HPV inclusi nel test HC2 (16-18-31-33-35-39-45-51-52-56-58-59-68). Il più basso VPP e VPN è risultato per il test che rileva tutti gli HPV, in quanto sono presenti HPV a basso/intermedio rischio che non sono associati a lesioni gravi. Nell'ambito di uno screening primario, quindi, risulta appropriato l'utilizzo di un test in Real-Time PCR come il test **Dx HR-HPV Auto Assay** (BIO-RAD). Questo test ad alta processività (permette l'analisi di 96 campioni a seduta, e quindi è adatto per il grande numero di campioni che caratterizzano lo screening) è in grado di rilevare i 13 genotipi principali ad alto rischio mediante l'amplificazione di due regioni target del virus (E1 e E6), consentendo quindi la rilevazione dell'HPV anche nei rari casi in cui c'è una completa integrazione del virus nella cellula ospite con la perdita del gene E1/L1. A tal proposito, per supportare quest'ipotesi, dovranno essere testati per la ricerca dell'HPV i campioni di pazienti con lesioni CIN2+ negativi ai test molecolari che hanno come target le regioni perse con l'integrazione. La sensibilità e la specificità del test BIO-RAD sono risultate elevate (97% e 95% rispettivamente) e i risultati concordano ottimamente con quelli ottenuti con le altre tecniche analizzate (**Tab. 22**). La criticità rilevata per questa metodica consiste essenzialmente nell'incapacità di genotipizzare l'HPV16 e HPV18, riscontrati nel 71% dei tumori invasivi e delle lesioni precancerose di tipo squamoso (*Muñoz et al., 2004*). Nell'ambito di uno screening secondario, ove viene richiesta la genotipizzazione per le donne con alterazioni al Pap test e nel follow-up delle donne che hanno subito trattamenti escissionali, un test che genotipizza tutti i tipi di HPV risulta invece fondamentale per le seguenti ragioni:

- Solo un test di genotipizzazione completa permette la rilevazione delle infezioni multiple, che possono essere un marcatore di progressione di lesione;

- Solo un test di genotipizzazione permette la discriminazione tra nuove infezioni ed infezioni pre-esistenti. Questo permette di identificare sia le infezioni persistenti, sia le recidive dovute al fallimento della terapia;
- Solo un test di genotipizzazione può fornire dati epidemiologici utili per lo sviluppo e la ricerca di strategie di vaccinazione mirate e popolazione-specifiche. Inoltre permette il monitoraggio delle frequenze dei genotipi ad alto rischio (ed eventuali cambiamenti nella capacità di favorire l'insorgenza di lesioni di alto grado) dopo il recente inserimento della vaccinazione per i genotipi HPV 16 e 18.

Nel nostro studio, l'analisi della distribuzione dei genotipi di HPV nelle varie classi di lesione cito/istologica ha mostrato che:

- la presenza di **genotipi ad alto rischio oncogeno**, come ampiamente dimostrato in letteratura (*Muñoz et al., 2004; Saslow et al., 2012*), è correlata con la presenza di una lesione istologica. Tra questi, la presenza del genotipo **HPV16** nel nostro studio è risultata associata ad un rischio 5 volte maggiore di sviluppare una lesione di alto grado (CIN3+) ed ad un diminuito rischio di sviluppare una lesione CIN1, in supporto all'idea che sarebbero opportuni protocolli mirati per la gestione delle donne HPV 16 positive; infatti, secondo quanto sostenuto dall'ultimo aggiornamento delle linee guida dell'American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP), poiché il virus HPV 16 è molto meno comune nelle lesioni CIN1 rispetto alle lesioni CIN3, le donne positive ad HPV 16, anche con citologia negativa, dovrebbero essere indirizzate verso l'analisi colposcopica (*Massad et al., 2013*). Nella popolazione analizzata la presenza di genotipi ad alto rischio diversi da HPV 16 è risultata indice della presenza di lesione, ma non di alto grado.
- Da un punto di vista prognostico, la **presenza contemporanea di più di un tipo di HPV** è risultata associata ad un rischio più che raddoppiato (rispetto all'infezione singola) di avere una lesione di basso/medio grado (CIN1/CIN2). La presenza di un solo tipo di HPV al contrario è risultata poco indicativa, in quanto possibile indice sia di assenza di lesione, sia di presenza di lesione di alto grado. Questi dati sono in parte in accordo con quanto già osservato da altri Autori. *Chaturvedi e collaboratori (2011)* hanno osservato un aumento delle infezioni multiple nei campioni con citologia H-SIL+ e non con CIN2+; nello studio tuttavia non è riportata la frequenza delle infezioni multiple suddivisa per classi di lesioni

istologica. Questa suddivisione manca anche nello studio di *Graia e collaboratori* (2009), che comunque riscontrano un'associazione significativa tra presenza di infezioni multiple e lesione istologica di alto grado (CIN2+). Diversi studi mostrano una correlazione tra coinfezione e lesione citologica, ma in molti di essi manca una corrispondente analisi della lesione istologica associata (*Trottier et al.*, 2006). Da un punto di vista patogenetico, i dati osservati sembrano suggerire l'ipotesi che più tipi di HPV favoriscano l'insorgere della lesione, ma che durante l'infezione sia la predominanza o la persistenza di un solo genotipo a causare lesioni di alto grado e lo sviluppo del cancro, come ipotizzato da *Soto-De Leon e collaboratori* nel 2011. E' da sottolineare il dato, infatti, che in nessun carcinoma analizzato è stata rilevata la presenza di più di un genotipo, in accordo con gran parte degli studi presenti in letteratura, dove raramente è stata riscontrata la presenza di infezioni multiple in carcinomi invasivi (*Soto-De Leon et al.*, 2011). La possibilità di valutare la carica dei diversi genotipi in coinfezione a tempi diverse potrebbe permettere di approfondire la problematica e capire se, nel corso dell'infezione, un genotipo prevale sull'altro o, in relazione al diverso potere oncogeno, cambia la prevalenza di un genotipi sull'altro. Sicuramente la carica è importante per capire il passaggio da infezione transiente ad infezione persistente, ma per poter inserire la valutazione di questo parametro in routine c'è la necessità di avere metodiche in Real-Time PCR quantitative standardizzate. In questa tesi si è cercato di valutare in quale percentuale, nelle infezioni multiple, è presente un genotipo predominante e valutare se alcuni genotipi sono più frequentemente presenti a carica più elevata rispetto ad altri. Ciò non è stato possibile per il limite delle metodiche impiegate in questa tesi. Sia il test High-risk HPV Genotype Related Real-time PCR (Liferiver) che il test RealLine HPV High Risk Genotype Fla-Format (BIORON) permettono la genotipizzazione ma non sono metodi quantitativi. Infatti l'efficienza dell'amplificazione dei vari genotipi è diversa, come diversa è l'efficienza della valutazione della cellularità del campione, parametro fondamentale per la normalizzazione della carica.

- Infezioni multiple tra genotipi a rischio oncogeno diverso espongono ad un diverso rischio di lesione. Nel nostro studio la presenza di più genotipi ad alto rischio è indice di lesione, raddoppiando il rischio di lesione CIN1 e CIN2, mentre la presenza di infezioni multiple tra genotipi ad alto rischio con altri a rischio intermedio/basso non aumenta il rischio di sviluppare una lesione istologica.

- Tutte le coinfezioni rilevate nelle lesioni di alto grado (3/3) sono dovute a genotipi ad alto rischio. Tuttavia, in generale, la presenza di più genotipi HR-HPV è risultata associata allo sviluppo di lesioni CIN1/2, piuttosto che di lesioni gravi (CIN3+), in accordo con la natura monoclonale del tumore: in altri termini è probabile che cellule diverse siano infettate con virus diversi, piuttosto che nella stessa cellula coesistano diversi genotipi virali. Nelle lesioni di alto grado e nei tumori invasivi una linea monoclonale si sviluppa da una cellula infettata con un singolo virus ad alto rischio, con la conseguenza di rilevare poche infezioni multiple nelle lesioni di alto grado e solo infezioni singole nei carcinomi (*Plummer et al., 2011*).
- La presenza del genotipo a rischio intermedio **HPV53** nel nostro studio è risultata associata ad un rischio elevato di lesione di medio grado (CIN2). Nessun campione con lesione CIN3+ è risultato positivo a questo genotipo, ma essendo la casistica delle lesioni di alto grado piuttosto limitata (46 casi) saranno necessari ulteriori studi per stabilire l'effettivo potere oncogeno di questo genotipo e quindi l'eventuale necessità di inserire la sua ricerca a livello di screening primario (attualmente i test presenti in commercio ad alta processività non sono in grado di rilevarlo). Allo stato attuale questo genotipo viene considerato a probabile alto rischio oncogeno (*Munoz et al., 2003*) poiché la sua presenza è stata rilevata in un caso di carcinoma invasivo.
- I test per la rilevazione e la genotipizzazione del virus HPV utilizzati nel nostro studio sono risultati più sensibili quando effettuati su prelievo citologico rispetto al prelievo istologico (79% dei positivi vs 71%). Infatti 61 campioni (circa il 15% dei campioni totali) risultati positivi su prelievo citologico, sono risultati negativi su campione biotico. Di questi soltanto 27 non presentavano lesione istologica, mentre 20 e 14 campioni presentavano rispettivamente una lesione CIN1 e CIN2. Diverse possono essere le motivazioni per spiegare la discordanza di positività fra campioni citologici e campioni istologici: a) la bassa rappresentatività del campione istologico che, spesso, è costituito da poco materiale e con DNA degradato dall'inclusione in paraffina; b) l'integrazione del DNA nella cellula con perdita della regione amplificata dal test impiegato; c) la diversa tempistica fra l'esecuzione del test HPV sul citologico e la conferma richiesta sul materiale istologico. Se l'infezione è in via di risoluzione e la carica è bassa, 6 mesi possono essere sufficienti per la negativizzazione del test molecolare sul reperto istologico; d) la diversa localizzazione del virus. Se questo è in fase produttiva e, soprattutto,

non si sta integrando si ritrova negli strati più superficiali e quindi le cellule infettate saranno maggiori in un prelievo citologico rispetto al prelievo istologico. Dall'altro lato, 29 campioni (circa il 7% dei campioni totali) negativi per HPV al prelievo citologico, sono risultati positivi nel campione istologico; tuttavia, tra questi, 19 sono risultati privi di lesione istologica e gli altri 10 positivi ad HPV a basso rischio, con lesione CIN1. La motivazione principale per spiegare la discordanza di positività fra campione citologico e campione istologico potrebbe essere la risoluzione di un'infezione persistente causata dall'integrazione della particella virale. Le cellule con il DNA integrato sono localizzate negli strati basali e pertanto quando la lesione regredisce il numero di cellule infettate sono presenti soprattutto in profondità. La valutazione della carica virale correlata al grado di integrazione, come verrà riportato in seguito, potrebbe permettere una gestione più efficace di questi casi.

- La capacità di rilevare le infezioni multiple nei campioni citologici è paragonabile a quella nei campioni bioptici (la più bassa frequenza riscontrata nei campioni citologici è falsata da più alto numero di campioni positivi). La più elevata porzione di infezioni multiple si rileva negli ASC-US: nel 56,5% (26/46) dei campioni positivi, e addirittura nel 64,7% (22/34) se si considerano soltanto le coinfezioni tra HPV ad alto rischio. Questi 22 campioni sono tutti risultati associati a lesione all'analisi istologica: 12 CIN1 (il 53% dei CIN1 derivanti da ASC-US) e 10 CIN2 (il 67% dei CIN2 derivanti da ASC-US). Quindi la presenza di infezione multipla di HPV ad alto rischio in questa particolare categoria citologica (nella quale il 50% dei casi non presenta alcuna alterazione neoplastica) può essere un utile strumento per la stratificazione del rischio.

L'analisi delle **cariche virali di HPV16** misurate nei campioni presi in esame ha fornito risultati in parte contrastanti con gli studi presenti in letteratura. Come atteso, i campioni con le cariche più basse sono risultati quelli della popolazione di controllo, cioè senza alcuna alterazione al Pap test. Confrontati con i campioni della stessa tipologia, anche quelli privi di alterazioni istologica all'esame bioptico risultano quelli con la carica più bassa. In contrasto con diversi studi che hanno mostrato una carica virale in aumento all'aumentare della lesione (*Boulet et al., 2009; Flores et al., 2007; Saunier et al., 2008*), i nostri dati hanno mostrato una chiara tendenza della carica virale ad assumere valori elevati in corrispondenza delle lesioni di basso grado L-SIL e CIN1 (sia nei campioni istologici sia nei campioni citologici corrispondenti) e

successivamente una tendenza a diminuire all'aumentare della gravità della lesione, fino al raggiungimento di livelli minimi in corrispondenza dei carcinomi invasivi.

La letteratura relativa alla correlazione tra carica virale e gravità della lesione è varia e controversa; come precedentemente descritto, esistono lavori nei quali questa correlazione viene chiaramente osservata (*Boulet et al., 2009; Flores et al., 2007; Saunier et al., 2008*), lavori nei quali nessun tipo di associazione viene misurata, soprattutto quando la carica viene normalizzata per il numero di cellule (*Andersson et al., 2005; Cheung et al., 2006; Guo et al., 2007; Manawapat et al., 2012; Zhang et al., 2008*), e alcuni lavori nei quali viene riscontrata una diminuzione della carica in corrispondenza delle lesioni di alto grado (*Xi et al., 2011; Tsai et al., 2005*). Questi lavori presentano diverse limitazioni, alcune delle quali presenti anche nel nostro studio:

1. Analisi effettuata soltanto sui campioni citologici senza alcuna corrispondenza con la lesione istologica associata;
2. Mancanza di una normalizzazione del dato: diversi studi riportano una carica virale assoluta, non riportata per numero di cellule;
3. Poca chiarezza nell'esposizione dei dati: in alcuni lavori l'analisi statistica è stata effettuata dividendo arbitrariamente i valori di carica virale in gruppi ad alta, media e bassa carica, piuttosto che analizzare le medie e le deviazioni standard ottenute per le diverse categorie di lesione;
4. Numero di campioni molto basso, soprattutto negli studi con un'analisi istologica associata: gran parte di essi si basano su poche centinaia di campioni, che suddivisi per le diverse categorie di lesione diventano 20-30 campioni per gruppo, talvolta inferiori a 10 per i carcinomi. Questa limitazione riguarda senz'altro anche il nostro studio. Dei 415 campioni di partenza, soltanto 104 sono risultati positivi all'HPV 16 e quindi sottoposti ad analisi; questo affligge soprattutto le categorie poco rappresentate come i campioni senza alterazione istologica (12), nei quali la frequenza dell'HPV 16 è intrinsecamente bassa, e i carcinomi (3), per la bassa prevalenza della malattia;
5. La misura della carica virale è molto variabile all'interno della stessa categoria di lesione. Questo è osservabile sia nel nostro studio, sia in tutti gli studi che riportano informazioni sulla dispersione del dato (*Boulet et al., 2009; Saunier et al., 2008; Schmitt et al., 2013; Tsai et al., 2005; Wentzensen et al., 2012; Andersson et al., 2005; Cheung et al., 2006; Guo et al., 2007; Manawapat et al., 2012*). Ad esempio

in una categoria in cui la media delle cariche osservata è molto alta, come i CIN1, alcuni campioni sono risultati a carica molto bassa, anche inferiori a 1 copia/cellula, e viceversa (**Graf. 21**). Soprattutto quest'ultimo aspetto limita molto la possibile applicazione della determinazione della carica virale come marcatore di lesione.

In conclusione, i nostri dati non supportano l'impiego della carica virale come marcatore indipendente di lesione, sia a causa dell'alta variabilità intrinseca del dato, sia per il fatto che nel nostro studio le basse cariche sono risultate associate sia a mancanza di lesione istologica, sia alla presenza di lesioni di alto grado e di carcinoma invasivo. Il monitoraggio della carica potrebbe però acquisire un significato diagnostico nel follow-up delle donne positive al test HPV: in caso di infezione transitoria la carica varierà nel tempo fino a negativizzarsi, mentre la persistenza di una carica virale bassa nel tempo è indice di infezione persistente. Ulteriori studi sono necessari per approfondire l'argomento. Sarebbe opportuno poter effettuare uno studio "Health Technology Assessment (HTA)" per valutare l'efficacia dell'inserimento del monitoraggio della carica nel follow-up delle donne positive, a partire dai metodi impiegati per lo studio.

Allo stesso modo, anche la determinazione del **grado di integrazione virale**, afflitto anch'esso da una notevole variabilità all'interno della stessa categoria di lesione, non sembra essere un buon marcatore. Nessuna correlazione è stata infatti riscontrata tra grado di integrazione e lesione, nonostante sia possibile osservare un aumento (statisticamente significativo) del grado di integrazione, misurato nei campioni biotici, nelle lesioni CIN2+ rispetto ai negativi e ai CIN1 (**Graf. 26**). Tuttavia, come in diversi studi in letteratura (*Boulet et al., 2009*), una discreta proporzione di virus integrato è stato rilevato anche nei campioni senza alterazione istologica (34%) e nelle lesioni CIN1 (33%). Questo dimostra che il processo di integrazione è un evento precoce nella trasformazione neoplastica, e quindi non può essere un valido marcatore per l'identificazione delle lesioni CIN2+.

Riguardo la patogenesi della malattia associata all'infezione da HPV 16 e il possibile ruolo sinergico di questi due marcatori di lesione il nostro studio fornisce importanti informazioni. Innanzitutto **la carica virale risulta elevata nelle lesioni di basso/medio grado e si abbassa nelle lesioni di alto grado e nei carcinomi**. Altra importante osservazione è il fatto che **il grado di integrazione virale nella cellula ospite è inversamente correlato con la carica virale**. Nel nostro studio gradi di integrazione virali

superiori al 50% sono associati a cariche virali inferiori a 1 copia/cellula. Da un punto di vista patogenetico questo implica che:

- Con il progredire della lesione il virus diminuisce/perde la capacità di replicare il proprio genoma. E' da sottolineare il fatto che la proteina E2, fattore di trascrizione virale necessario per l'inizio della replicazione del genoma del virus, non è espressa nelle linee cellulari dei carcinomi cervicali; inoltre è stato recentemente dimostrato che l'espressione della proteina E2 *in vivo* (su sezioni derivanti da biopsie cervicali) è elevata nelle lesioni CIN1 e CIN2, mentre decresce nelle lesioni di alto grado ed è assente nei carcinomi (*Xue et al., 2010*). Questi dati sono supportati dal nostro studio, nel quale lesioni di alto grado e soprattutto i carcinomi presentano cariche virali estremamente basse;
- Il fenomeno dell'integrazione virale è associato direttamente o indirettamente alla perdita della capacità di replicazione virale. L'integrazione infatti comporta la rottura del gene E2, con conseguente over-espressione delle oncoproteine E6 ed E7, ma anche la perdita dell'espressione della proteina E2 e della capacità di replicare il proprio genoma. Tuttavia, nel nostro studio non sempre a lesioni di alto grado è risultato associato un elevato grado di integrazione, anche se in tutti è stata misurata una bassa carica. Il recente studio di *Xue e collaboratori (2012)* ha evidenziato che non sempre la mancanza di espressione della proteina E2, rilevata nelle lesioni di alto grado tramite immuno-istochimica su sezioni biotiche, è associata ad una mancanza di espressione del gene E2; infatti questi Autori in diversi casi di carcinoma rilevano l'mRNA ma non la proteina E2, ipotizzando quindi altri fenomeni, diversi dalla distruzione del gene E2, in grado di inibire l'espressione della proteina, con conseguente perdita della replicazione virale, e favorire l'espressione delle onco-proteine E6/E7. Queste osservazioni sono in accordo con quanto osservato nel nostro studio, dove la perdita del gene E2 è risultata sempre associata ad una bassa carica, ma non viceversa.

Da un punto di vista prognostico i dati del nostro studio suggeriscono che l'utilizzo dei due marcatori "carica virale" e "integrazione" non forniscono in maniera indipendente informazioni utili, ma che possono essere validi strumenti se utilizzati in affiancamento ad altri test. In particolare:

- La rilevazione di basse cariche di HPV 16 in campioni con lesione citologica al Pap test è un forte indice di lesione istologica di alto grado;

- La rilevazione contemporanea di una bassa carica di HPV 16 e di un elevato grado di integrazione virale è indice di lesione di alto grado.

In ultima istanza, è da sottolineare il fatto che il nostro studio, per esigenze di casistica, si è basato sull'analisi di questi due marcatori per il solo HPV 16, genotipo per il quale è noto l'elevato potere oncogeno delle oncoproteine E6/E7 ed il processo di integrazione virale sembra non rappresentare un evento fondamentale per la trasformazione neoplastica (*Vinokurova et al., 2008*). Ulteriori studi con casistiche idonee sono necessari per lo studio di questi due marcatori in genotipi ad alto rischio di HPV diversi dall'HPV16, in particolare per quei genotipi in cui il processo di integrazione virale sembra rivestire un ruolo più importante nella trasformazione neoplastica, come l'HPV18 e 45 (*Vinokurova et al., 2008; Badaracco et al., 2002*).

BIBLIOGRAFIA

- Abreu A. L. P. (2012). A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology Journal*; 9: 262.
- Anderson M. et al. (1992). A text and atlas of integrated colposcopy. *Chapman & Hall*, London.
- Andersson S. et al. (2005). Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *BJC* 92: 2195-2200.
- Anttila A. et al. (2010). Rate of cervical cancer, severe intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma in situ in primary HPV DNA screening with cytology triage: randomised study within organized screening programme. *BMJ*; 340: c1804.
- Arbyn M. et al. (2005). Clinical utility of HPV DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN. An update of pooled evidence. *Gynecol Oncol*; 99 (3): 7–11.
- Arbyn M. et al. (2010). European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second Edition—Summary Document. *Ann Oncol*; 21: 448–458.
- Arbyn M. et al. (2013). The APTIMA HPV assay versus the Hybrid Capture 2 test in triage of women with ASC-US or LSIL cervical cytology: a meta-analysis of the diagnostic accuracy. *Int J Cancer*; 132 (1): 101-8.
- Arias-Pulido H. et al. (2006). Human Papillomavirus Type 16 Integration in Cervical Carcinoma In Situ and in Invasive Cervical Cancer. *J Clin Microbiol*; 44 (5): 1755-1762.
- Azizi N. et al. (2008). Influence of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E2 polymorphism on quantification of HPV-16 episomal and integrated DNA in cervicovaginal lavages from women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol*; 89: 1716-1728.
- Badaracco G. et al. (2002). HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol*; 67 (4): 574-582.
- Barbieri D. et al. (2012). Comparison of HPV sign Genotyping Test with INNO-LiPA HPV Genotyping Extra assay on histologic and cytologic cervical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 74 (1): 43-8.

- Bianchi L. et al. (2013). Cellularity control and microbiological sample suitability: key Role of Real Time-PCR in sexually transmitted diseases reporting. *Biochimica Clinica*; 37: S142.
- Bigras G. and de Marval F. (2005). The probability for a Pap test to be abnormal is directly proportional to HPV viral load: results from a Swiss study comparing HPV testing and liquid-based cytology to detect cervical cancer precursors in 13842 women. *Brit J Cancer*; 93: 575-581.
- Bodily J. and Laimins L. A. (2011). Persistence of human papilloma virus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol*; 19 (1): 33-39.
- Bosch F. X. et al. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*; 55: 244-265.
- Boulet G. A.V. et al. (2009). Human Papillomavirus 16 Load and E2/E6 Ratio in HPV16-Positive Women: Biomarkers for Cervical Intraepithelial Neoplasia ≥ 2 in a Liquid-Based Cytology Setting? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 18: 2992-2999.
- Bray F. et al. (2005). Incidence Trends of Adenocarcinoma of the Cervix in 13 European Countries. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 14 (9).
- Buckley C.H. et al. (1982). Cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol*; 35:1-13.
- Burger E. A. et al. (2011). HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. *Gynecol Oncol*; 120 (3): 430-8.
- Calleja-Macias I. E. et al. (2005). Papillomavirus Subtypes Are Natural and Old Taxa: Phylogeny of Human Papillomavirus Types 44 and 55 and 68a and -b. *J Virol*; 79 (10): 6565-6569.
- Campos N. G. et al. (2011). Persistence of Concurrent Infections with Multiple Human -Papillomavirus Types: A Population based Cohort Study. *J Infect Dis*; 203: 823-827.
- Carozzi F. M. et al. (2011). Comparison of Clinical Performance of Abbott RealTime High Risk HPV Test with That of Hybrid Capture 2 Assay in a Screening Setting. *J Clin Microbiol*; 49 (4): 1446-1451.
- Castle P. E. et al. (2002). Restricted cross-reactivity of hybrid capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 11 (11): 1394-9.

- Castle P.E. et al. (2005). A prospective study of age trends in cervical human papillomavirus acquisition and persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*; 191(11):1808-16.
- Castle P. E. et al. (2010). The age-specific relationships of abnormal cytology and human papillomavirus DNA results to the risk of cervical precancer and cancer. *Obstet Gynecol*; 116: 76–84.
- Chan P. K. S. et al. (2007). Profile of Viral Load, Integration, and E2 Gene Disruption of HPV58 in Normal Cervix and Cervical Neoplasia. *J Infect Dis*; 196: 868-875.
- Chaturvedi A.K. et al. (2005). Prevalence and Clustering Patterns of Human Papillomavirus Genotypes in Multiple Infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 14: 2439-2445.
- Cheung J. L. K. et al. (2006). Viral Load, E2 Gene Disruption Status, and Lineage of Human Papillomavirus Type 16 Infection in Cervical Neoplasia. *J Infect Dis*; 194: 1706-1712.
- Cheung J. L. K. et al. (2009). Analysis of Human Papillomavirus Type 18 Load and Integration Status from Low-Grade Cervical Lesion to Invasive Cervical Cancer. *J Clin Microbiol*; 47 (2): 287-293.
- Chiaradia G. et al. (2007). Epidemiologia dell'infezione da HPV e delle malattie correlate. *IJPH*; 4 (2): 3-11
- Clad A. et al. (2011). Performance of the Aptima High-Risk Human Papillomavirus mRNA Assay in a Referral Population in Comparison with Hybrid Capture 2 and Cytology. *J Clin Microbiol*; 49 (3): 1071-1076.
- Costa S. et al. (2005). Gestione delle pazienti con pap test anormale. Vol. 1.
- Constandinou-Williams C. et al. (2010). Is Human Papillomavirus Viral Load a Clinically Useful Predictive Marker? A Longitudinal Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 19(3).
- Cox T. and Cuzick J. (2006). HPV DNA testing in cervical cancer screening: From evidence to policies. *Gynecol Oncol*; 103: 8-11.
- Cutts F. T. (2007). Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. *Bulletin of the World Health Organization* ; 85 (9).
- Cuzick J. et al. (2003). Management of women who test positive for high-risk types of human papillomavirus: the HART study. *Lancet*; 362: 1871–76.

- Cuzick J. et al. (2006). Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*; 119, 1095–1101.
- Cuzick J. et al. (2008). Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine*; 26 (10): 29-41.
- de Jonge M. et al. (2013). Human Papillomavirus Genotype Distribution in Cytologically Screened Women from Northwest Germany. *Acta Cyt*; 57: 591-598.
- de Villiers E. M. et al. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*; 324.
- Dillner J. et al. (2008). Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ*; 377: a1754.
- Donati S. et al. (2013). Human Papillomavirus multiple infections: comparison between cytological and histological lesions. *Eurogin, 2013*. Oral communication.
- Fahey M. T. et al. (1995). Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol*; 141: 680–9
- Flores Y. N. et al. (2007). Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico. *Salud pública de México*; 50 (1).
- Flores-Munguia R. et al. (2004). Performance Assessment of Eight High-Throughput PCR Assays for Viral Load Quantitation of Oncogenic HPV Types. *J Mol Diagn*; 6 (2).
- Frazer I. H. (2004). Prevention of cervical cancer through papilloma virus vaccination. *Nat Rev Immunol*; 4 (1): 46-54.
- Frazer I. H. (2009). Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well envolved relationship. *Virology*; 384: 410-414.
- Garcia-Espinosa B. et al. (2012). Genotype distribution of human papilloma virus (HPV) in histological sections of cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma in Madrid, Spain. *BMC Cancer*; 12:533.
- Gillison M. L. et al. (2014). Eurogin Roadmap: Comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix. *Int. J. Cancer*; 134: 497-507.
- Giorgi Rossi P. et al. (2010). The effect of self-sampled HPV testing on participation to cervical cancer screening in Italy: a randomised controlled trial. *BJC*; 104: 248-254.

- Graia S. et al. (2009). Infezioni cervicali da genotipi multipli di Human Papillomavirus: prevalenza ed impatto sul rischio di lesioni cervicali intraepiteliali. *Boll Soc Med Chir Pavia*; 122: 537 – 566.
- Gravitt P. E. et al. (2003). A Comparison between Real-Time Polymerase Chain Reaction and Hybrid Capture 2 for Human Papillomavirus DNA quantitation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 12: 477-484.
- Gravitt P. E. et al. (2007). High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease. *Int J Cancer*; 121 (12): 2787–93.
- Grundhoefer D. and Patterson B. K. (2001). Determination of Liquid-Based Cervical Cytology Specimen Adequacy Using Cellular Light Scatter and Flow Cytometry. *Comm Clin Cytometry*; 46:340–344.
- Guan P. et al. (2012). Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer*; 131: 2349–2359.
- Guo M. et al. (2007). Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Modern Pathol*; 20: 256-266.
- Gyllesten U. et al. (2011). Short-time repeat high-risk HPV testing by self-sampling for screening of cervical cancer. *BJC*; 105: 694-697.
- Ho L. et al. (1991). Sequence Variants of Human Papillomavirus Type 16 in Clinical Samples Permit Verification and Extension of Epidemiological Studies and Construction of a Phylogenetic Tree. *J Clin Microbiol*; 29 (9): 1765-1772.
- Howie H. L. et al. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology*; 384: 324-334.
- IARC Handbooks of Cancer Prevention. Vol. 10, 2005.
- Ibáñez R. et al. (2012). Prediction of cervical intraepithelial neoplasia grade 2+ (CIN2+) using HPV DNA testing after a diagnosis of atypical squamous cell of undetermined significance (ASC-US) in Catalonia, Spain. *BMC Infectious Diseases*; 12: 25.
- Jones P. H. et al. (2007) Sic transit Gloria: farewell to the epidermal transit amplifying cell? *Cell Stem Cell*; 1: 371-381.
- Katki H. A. (2011). How might HPV testing be integrated into cervical screening? *Lancet Oncol*; 13 (1): 8–10.

- Keegan H. et al. (2004). Comparison of DNA extraction from cervical cells collected in PreservCyt solution for the amplification of *Chlamydia trachomatis*. *Cytopathol*; 16: 82-87.
- Khan M. J. et al. (2005). The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst*; 97(14):1072-9.
- Kim M. J. et al. (2013). Type-specific prevalence of high-risk human papillomavirus by cervical cytology and age: Data from the health check-ups of 7,014 Korean women. *Obstet Gynecol Sci*; 56 (2): 110-120.
- Kines R. C. et al. (2009). The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci*; 106: 20458-20463.
- Koutsky L. et al. (1997). Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med*; 102 (5A): 3-8.
- Kovacic M. B. Relationships of Human Papillomavirus Type, Qualitative Viral Load, and Age with Cytologic Abnormality. *Cancer Res*; 66: (20).
- Ley C. et al. (1991). Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J Natl Cancer Inst*; 83: 997–1003.
- Liaw K. L. et al. (2001). A Prospective Study of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 DNA Detection by Polymerase Chain Reaction and Its Association with Acquisition and Persistence of Other HPV Types. *J Infect Dis*; 183: 8-15.
- Manawapat A. et al. (2012). Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study. *Am J Cancer Res*; 2 (2): 192-203.
- Markowitz L. E. (2007). Centers for Disease Control and Prevention. Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine. *MMRW*; 56.
- Martin P. et al. (2011). Human papillomavirus genotype distribution in Madrid and correlation with cytological data. *BMC Infectious Diseases*; 11: 316.
- Massad L. S. et al. (2013). 2012 Updated Consensus Guidelines for the Management of Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *Journal of Lower Genital Tract Disease*; 17 (5): 1-27.
- Mateos Lindemann M. L. et al. (2011). Prevalence and Distribution of High-Risk Genotypes of HPV in Women with Severe Cervical Lesions in Madrid, Spain:

Importance of Detecting Genotype 16 and Other High-Risk Genotypes. *Adv Prev Med*; 11.

- McBride A. A. et al. (2006). Partitioning viral genomes in mitosis: same idea, different target. *Cell Cycle*; 5: 1499-1502.
- Meijer C. J. L. M. et al. (2009). Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*; 124: 516–520.
- Melnikow J. et al (1998). Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*; 92 (4):727-35.
- Mesher D. et al. (2010). Long-term follow-up of cervical disease in women screened by cytology and HPV testing: results from the HART study. *Brit J Cancer*; 102: 1405-1410.
- Muñoz N. et al. (2003). Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med*; 348: 518-527.
- Muñoz N. et al. (2004). Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int. J. Cancer*; 111: 278–285.
- Naucler P. et al. (2007) Human Papillomavirus and Papanicolaou Tests to Screen for Cervical Cancer. *N Engl J Med* 357;16.
- Nygård M. et al. (2013). Comparative effectiveness study on human papillomavirus detection methods used in the cervical cancer screening programme. *BMJ Open*; 4:e003460.
- Ostör A.G. (1993). Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*;12(2):186-92.
- Panatto D. et al. (2013). Prevalence of human papillomavirus in young Italian women with normal cytology: how should we adapt the national vaccination policy? *BMC Infectious Diseases*; 13: 575.
- Pang Y. et al. (2008). Restoring Satisfactory Status in ThinPrep Pap Test Specimens With Too Few Squamous Cells and Containing Microscopic Red Blood Cells. *Diagn Cytopathol*; 36 (10).
- Park Y. et al. (2012). Comparison of the Abbott RealTime High-Risk Human Papillomavirus (HPV), Roche Cobas HPV, and Hybrid Capture 2 Assays to Direct Sequencing and Genotyping of HPV DNA. *JCM*; 50 (7): 2359-2365.
- Parkin D. M. and Bray F. (2006). The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*; 24 (S3): 11-25.

- Peevor R. et al. (2011). Development of optimal liquid based cytology sample processing methods for HPV testing: minimising the 'inadequate' test result. *J Virol Methods*; 173 (2) :374-7.
- Peitsaro P. et al. (2002). Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found in Cervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique. *J Clin Microbiol*; 40 (3): 886-891.
- Pett M and Coleman N. (2007). Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol*; 212: 356–367.
- Plummer M. et al. (2011). Multiple Human Papillomavirus Infections: The Exception or the Rule? *J Infect Dis*; 203: 891-893.
- Poljak M. et al. (2005). Retrospective and prospective evaluation of the Amplicor HPV test for detection of 13 high-risk human Papillomavirus genotypes on 862 clinical samples. *Acta Dermatoven APA*; 14 (4).
- Poljak M. and Kocjan B. J. (2010). Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 8 (10): 1139-1162.
- Porras C. et al. (2012). Switch from Cytology-based to HPV-based Cervical Screening: Implications for Colposcopy. *Int J Cancer*; 130 (8): 1879-1887.
- Ramanakumar A. V. (2010). Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC Infectious Diseases*; 10: 326.
- Ratnam S. et al. (2011). Aptima HPV E6/E7 mRNA Test Is as Sensitive as Hybrid Capture 2 Assay but More Specific at Detecting Cervical Precancer and Cancer. *J Clin Microbiol*; 49 (2): 557-564.
- Roberts I. et al. (2008). Critical evaluation of HPV16 gene copy number quantification by SYBR green PCR. *BMC Biotechnology*, 8:57.
- Ronco G. et al. (2005). Prevalence of human papillomavirus infection in women in Turin, Italy. *Eur J Cancer*; 41 (2): 297-305.
- Ronco G. et al. (2007). HPV triage for low grade (L-SIL) cytology is appropriate for women over 35 in mass cervical cancer screening using liquid based cytology. *Eur J Cancer*; 43:476–80.
- Ronco G. et al. (2012). Ricerca del dna di papillomavirus umano (HPV) come test primario per lo screening dei precursori del cancro del collo uterino. *Epidemiologia & Prevenzione*; 36 (3).

- Ronco G. et al. (2013). Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomized controlled trials. *Lancet*.
- Saslow D. et al. (2012). American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. *Ca Cancer J Clin*; 62:147-172.
- Saunier M. et al. (2008). Analysis of Human Papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA Load and Physical State for Identification of HPV16-Infected Women with High-Grade Lesions or Cervical Carcinoma. *J Clin Microbiol*; 46 (11): 3678-3685.
- Schlecht N. F. et al. (2003). Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*; 103: 519–524.
- Schmitt M. et al. (2010). Abundance of Multiple High-Risk Human Papillomavirus (HPV) Infections Found in Cervical Cells Analyzed by Use of an Ultrasensitive HPV Genotyping Assay. *J Clin Microbiol*; 48 (1): 143-149.
- Schmitt M. et al. (2013). Multiple Human Papillomavirus Infections with High Viral Loads Are Associated with Cervical Lesions but Do Not Differentiate Grades of Cervical Abnormalities. *JCM*; 51 (5): 1458-1564.
- Siebers A. J. et al. (2012). Causes and Relevance of Unsatisfactory and Satisfactory but Limited Smears of Liquid-Based Compared With Conventional Cervical Cytology. *Arch Pathol Lab Med*; 136.
- Solomon D. et al. (2002). The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*; 287 (16).
- Soto-De Leon S. et al. (2011). Distribution Patterns of Infection with Multiple Types of Human Papillomaviruses and Their Association with Risk Factors. *PloS One*; 6 (2): e14705.
- Stanley M. (2008). Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol*; 109: S15-21.
- Swan D. C. et al. (1999). Human Papillomavirus (HPV) DNA Copy Number Is Dependent on Grade of Cervical Disease and HPV Type. *J Clin Microbiol*; 37 (4): 1030-1034.
- Syrjänen K. J. (1997) Biological behavior of cervical intraepithelial neoplasia. *New Developments in cervical Cancer Screening and Prevention, Blackwell Science*; 93-108.

- Tabora N. et al. (2008). High HPV 16 Viral Load is Associated with Increased Cervical Dysplasia in Honduran Women. *Am J Trop Med Hyg*; 78(5): 843–846.
- Tropé A. et al. (2012). Cytology and Human Papillomavirus Testing 6 to 12 Months after ASCUS or LSIL Cytology in Organized Screening To Predict High-Grade Cervical Neoplasia between Screening Rounds. *J Clin Microbiol*; 50 (6): 1927-1935.
- Trottier H. et al. (2006). Human Papillomavirus Infections with Multiple Types and Risk of Cervical Neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 15: 1274-1280.
- Tsai H. T. et al. (2005). Association between Quantitative High-Risk Human Papillomavirus DNA Load and Cervical Intraepithelial Neoplasm Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 14: 2544-2549.
- Turrisi S. et al. (2013). Cellularity control: key test for evaluation of sample adequacy in the molecular diagnosis of HPV and other sexually transmitted diseases. *Eurogin 2013*. Oral communication.
- Vaccarella S. et al. (2010). Concurrent Infection with Multiple Human Papillomavirus Types: Pooled Analysis of the IARC HPV Prevalence Surveys. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 19: 503-510.
- van Hamont D. et al. (2006). Evaluation of the SPF10-INNO LiPA Human Papillomavirus (HPV) Genotyping Test and the Roche Linear Array HPV Genotyping Test. *J Clin Microbiol*; 44 (9): 3122-3129.
- Villa L. L. (2007). Prophylactic Efficacy of a Quadrivalent Human Papillomavirus (HPV) Vaccine in Women with Virological Evidence of HPV Infection *J Infect Dis*; 196:1438–46.
- Vinokurova S. et al (2008). Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions. *Cancer Res*; 68 (1).
- Walboomers J. M. M. et al. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol*; 182: 12-19.
- Wang H. L. and Lu D.W. (2004). Detection of human papillomavirus DNA and expression of p16, Rb, and p53 proteins in small cell carcinomas of the uterine cervix. *Am J Surg Pathol*; 28 (7): 901-8.
- Weissenborn D. J. et al. (2003). Oncogenic Human Papillomavirus DNA Loads in Human Immunodeficiency Virus-Positive Women with High-Grade Cervical Lesions Are Strongly Elevated. *J Clin Microbiol*; 41 (6): 2763-2767.

- Wentzensen N. et al. (2012). Human Papillomavirus Load Measured by Linear Array Correlates with Quantitative PCR in Cervical Cytology Specimens. *J Clin Microbiol*; 50 (5): 1564–1570.
- Wheeler C. M. et al. (2006). Human Papillomavirus Genotypes and the Cumulative 2-Year Risk of Cervical Precancer. *J Infect Dis*; 194: 1291-1299.
- Winer R. L. et al. (2005). Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *J Infect Dis*; 191 (5): 731–738.
- Woodman C. B. J. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature*; 7.
- Xi L. F. et al. (2011). Viral Load in the Natural History of Human Papillomavirus Type 16 Infection: A Nested Case–control Study. *J Infect Dis*; 203: 1425-1433.
- Xu Y. et al. (2009). High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia and Viral Load of High-Risk Human Papillomavirus: Significant Correlations in Patients of 22 Years Old or Younger. *Int J Clin Exp Pathol*; 2: 169-175.
- Xue Y. et al. (2010). HPV16 E2 Is an Immediate Early Marker of Viral Infection Preceding E7 Expression in Precursor Structures of Cervical Carcinoma. *Cancer Res*; 70: 5316-5325.
- Xue Y. et al. (2012). Loss of HPV16 E2 Protein Expression Without Disruption of the E2 ORF Correlates with Carcinogenic Progression. *The Open Virology Journal*; 6: 163-172.
- Zappacosta B. et al. (2009). Detection of 14 human papillomavirus genotypes in cervical samples in women from a central-southern area of Italy showing different Pap test results. *New Microbiologica*; 32: 351-358.
- Zhang D. et al. (2010). Comparison of prevalence, viral load, physical status and expression of human papillomavirus-16, -18 and -58 in esophageal and cervical cancer: a case-control study. *BMC Cancer*; 10: 650.
- Zhang W. Y. et al. (2008). Prevalence of high-risk human papillomavirus infection in different cervical lesion among organized health-examination women in Shanghai, China. *Chin Med J*; 121(16):1578-1582.
- zur Hausen H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature*; 2.
- zur Hausen H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*; 384 : 260–265.

RINGRAZIAMENTI

È arrivato il momento dei ringraziamenti finali. La prima persona che vorrei ringraziare e a cui vanno i miei complimenti sono IO. Sì, proprio io. Io che in questi due anni e mezzo mi sono impegnato, ho sudato, faticato, preso brontolate (tante), ho fatto le ore piccole al pc e la settimana non era altro che un susseguirsi di giorni senza festività. Voglio farmi i complimenti perché non ho mollato, ho sofferto e tanto ma a bocca chiusa, ho passato notti insonni e risvegli ansiosi, giornate cupe e chiuse su un pc. Oggi finalmente è arrivato! Un inizio e non una fine, da oggi inizia un qualcosa di nuovo, mai provato, che richiederà ancora più fatica e sacrifici, ma che mi troverà quantomeno pronto.

Ringrazio mio padre e mia madre, perché sono qui grazie al loro amore e alle loro fatiche quotidiane, non mi hanno mai fatto mancare niente e il loro sorriso sarà il loro più bel regalo di Laurea.

Ringrazio mio Zio Luciano, che purtroppo non potrà essere qui con me fisicamente in questo giorno importante, ma sarà ugualmente presente, nel mio cuore. Lui che è stato il mio primo maestro, lui che mi ha insegnato ad usare i pc quando ancora in pochi li conoscevano e ancora meno li avevano in casa, lui che amava la storia ed era Curioso, quella Curiosità che mi ha tramandato, perché la curiosità muove lo scienziato, lui mi ha insegnato ad essere Curioso.

Ringrazio Loria perché con bastone (tanto) e carota (poca) ha saputo insegnarmi moltissimo, la ringrazio per essere stata maestra di vita prima di tutto; una persona tra le più intelligenti mai conosciute dalla quale c'è tanto da imparare. Non si è mai arresa nello stimolarmi e spronarmi a qualsiasi ora del giorno e della sera: UNICA.

Ringrazio Zale, una sorella, sempre presente (cellulare a parte), ha fatto un lavoro estenuante nell'aiutarmi in questa tesi, la parola giusta al momento giusto, l'ho cercata quando ero giù, quando per il mio essere permaloso mi arrabbiavo con me stesso, quando non sapevo come fare e dove battere la testa lei era presente: INSOSTITUIBILE.

Ringrazio l'U.O. di Microbiologia, l'U.O. Anatomia Patologica e tutti i tecnici, il dottor Lari e la dott.ssa Rapicano che hanno permesso questo studio. Ringrazio il professor Landi meticoloso osservatore, ottima persona e presenza costante nel periodo di internato. Ringrazio i correlatori prof. Pistello e prof.ssa Tavanti per i consigli dati al fine di migliorare la tesi.

Ringrazio anche Lei, che durante questo cammino ha deciso che le nostre vite dovevano prendere strade diverse. La ringrazio perché le domeniche estive e le varie festività passate a studiare su quella scrivania assieme, non me le ha mai fatte sentire un peso, e se ora sono arrivato a questo traguardo è grazie anche a quelle domeniche a studiare su quella scrivania.

Ringrazio il mio vero amico Cruz, presenza costante nella mia vita, spalla nei momenti tristi, ha saputo con delicatezza ed efficacia tirarmi su da uno dei periodi più brutti della mia vita, sempre presente in ogni momento. Arriva quando ne hai bisogno e senza che tu glielo chieda. Una delle persone migliori che abbia mai conosciuto, le risate accompagnano le ore passate insieme, ci cerchiamo a vicenda, Amicizia vera. Quando le altre persone scambiano i nostri nomi nel chiamarci significa che siamo veramente una gran coppia e anche agli altri arriva questa unione. Per te una sola ma importante parola: GRAZIE!